BAND 29, HEFT 3 MAI 1957

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi, Kyoto / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich

M. Klinkowski Aschersleben

H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 41 Abbildungen

1957

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 29 **Heft 3** *S. 233—348 Berlin 1957*

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE 7 JUN 1957

INHALT

Abhandlungen

ZECK, W., Untersuchungen über Infektionsverhältnisse bei der *Phytophthora*-Knollenfäule und über deren Beeinflußbarkeit durch Kupferdüngung. Mit 12 Abb. 233

GÄUMANN, E., und E. BACHMANN, Über den Einfluß des Lycomarasmins und seiner Schwermetallkomplexe auf die Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten. Mit 5 Abb. 265

CASARINI, B., Il saggio „in vivo" degli anticrittogamici. Con 3 figure 277

MÜLLER, E., und M. TOMAŠEVIČ, Kulturversuche mit einigen Arten der Gattung *Leptosphaeria* Ces. et de Not. Mit 1 Abb. 287

TUNKL, M., und Z. DEVIDÉ, Über Sklerotienbildung bei *Pyronema domesticum* (Sow.) Sacc. Mit 1 Abb. 295

BAZZIGHER, G., Tannin- und phenolspaltende Fermente dreier parasitischer Pilze. Mit 2 Abb. 299

HASSEBRAUK, K., und R. KAUL, Vergleichende chemische Untersuchungen des Atmungsstoffwechsels von Weizenkeimpflanzen unterschiedlicher Braunrostanfälligkeit. Mit 6 Abb. 305

SCHMIDLE, A., *Phomopsis mali* Roberts als Erreger von Rindenschäden an Pflaumenbäumen. Mit 7 Abb. 327

SCHMIEDEKNECHT, M., Beitrag zur Morphologie und Cytologie von *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. Mit 4 Abb. 339

Besprechungen 346

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.

„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.

Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19.

Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 68, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.

Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 20 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,— DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Abonnementspreis dieses Heftes 24,— DM **Einzelpreis 26,40 DM**

Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. Braun

Untersuchungen über Infektionsverhältnisse bei der *Phytophthora*-Knollenfäule und über deren Beeinflußbarkeit durch Kupferdüngung

Von

WALTER ZECK

Mit 12 Abbildungen

Inhalt: I. Einleitung. II. Methodisches. III Ergebnisse aus Freilandversuchen mit Spontanbefall. IV. Ergebnisse eines Gefäßversuches mit künstlicher Infektion. V. Untersuchungen über den Infektionsmodus der Knollen. a) Infektionsweg; b) Ort des Eindringens; c) Altersabhängigkeit der Infektion. VI. Die Bedeutung der Bodenverhältnisse. a) für die Knolleninfektion, b) für die Verfügbarkeit des Kupfers. VII. Diskussion der Ergebnisse. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

I. Einleitung

In der 1861 erschienenen Schrift „Die gegenwärtig herrschende Kartoffelkrankheit" führt DE BARY den *Phytophthora*befall der Kartoffelknolle auf oberirdisch gebildete Sporangien zurück, die mit Regentropfen in den Boden und an die Knollen gespült werden. Ein Herabwachsen des Myzels von kranken Blättern durch Stengel und Stolo bis zur Knolle wird von einigen Autoren zwar für möglich gehalten, soll aber nach RIEHM (1912), MCKAY (1955) u. a. für den Knollenbefall nur von untergeordneter Bedeutung sein. Es liegt daher der Gedanke nahe, durch Bodenbehandlung die Knollen vor Infektion zu schützen. Für eine solche Möglichkeit sprechen bereits die Versuche von JONES u. M. (1912), in denen sie zum Nachweis des oben angeführten Infektionsweges den Boden mit Kupferkalkbrühe bespritzten und dabei einen deutlichen Rückgang im Knollenbefall erzielten. Ferner verglichen SKAPTASON u. M. (1940) die Krankheitsziffern von „old soils" (schon jahrzehntelang in Kartoffelkultur stehende Böden) mit denen von „virgin soils" (erstmalig in Kartoffelkultur genommene Böden). Den nur geringen Anteil fauler Knollen auf ersteren führten sie auf den hohen Kupfergehalt des Bodens zurück, in dem bei den häufigen

Spritzungen herabfallende Brühetropfen zu einem allmählichen Cu-Anstieg führen. Auch PETERSON (1947) sah hierin den Grund für die nur geringe Lebensfähigkeit der *Phytophthora* - Sporangien in Kartoffelböden Long Islands.

Nachdem ich 1956 den Einfluß von Kupfersulfatdüngung auf die Krautfäule geprüft hatte, untersuchte ich die Auswirkung dieser Behandlung auch auf die Knollenfäule.

Einführende Gefäß- und Freilandversuche lenkten dabei das Augenmerk auf die Infektionsverhältnisse der Knolle, die bisher nur unzureichend experimentell unterbaut sind. Das gilt einmal für den Ort des Eindringens. Nach DE BARY (1861) und JONES u. M. (1912) können die Hyphen an jeder Stelle der Knolle eindringen; alle übrigen bestreiten dies. HECKE (1898) und VOHWINKEL (1926) sahen in den Augen die bevorzugten Eintrittspforten; LÖHNIS (1922) dagegen gelangen, zumindest an den ruhenden Augen, keine Infektionen. Die Angabe von LÖHNIS (1923), daß auch Lentizellen, besonders wenn sie gewuchert sind, für die Infektion in Frage kommen, konnte VOHWINKEL (1926) nur bedingt bestätigen. Übereinstimmend werden dagegen Verletzungen als häufigste Befallsursachen angesehen. Über die Anfälligkeit des Stolos hat man sich m. W. bisher noch keine Gedanken gemacht. Neuere Arbeiten liegen zu den genannten Fragen nicht vor.

Ein weiterer Gesichtspunkt, die Bedeutung des Reifegrades der Knolle für die Infektion, ist von BOYD und HENDERSON (1953) aufgegriffen worden. Ihre Versuche, wie auch alle übrigen hier angeführten, können nur sehr bedingt zur Klärung des Infektionsvorganges unter natürlichen Bedingungen beitragen, da

1. nur abgeerntete Knollen verwendet wurden,
2. bis auf eine Ausnahme (BOYD u. M.) der Reifezustand der Knollen nicht beachtet wurde,
3. auch bei vorsichtiger Behandlung der Knolle Verletzungen bei der Ernte kaum zu vermeiden sind (siehe VOHWINKEL 1926 S. 628 f.).

In eigenen Versuchen, in denen es neben dem Eindringungsort im besonderen um die Bedeutung der Lentizellwucherungen und des Reifegrades der Knolle für die Infektion geht, sind deshalb die Knollen nach Möglichkeit in ihrer natürlichen Lage an der Mutterpflanze infiziert worden. Abschließende Versuche behandeln den Bodeneinfluß auf Infektion und Kupferwirkung.

II. Methodisches

Für die Wasserkulturversuche wurden Nährlösung und Methode nach KOPETZ und STEINECK (1949) verwendet.

Die Bestimmung des Kupfers erfolgte colorimetrisch mit dem Photometer „Eppendorf" nach der Na - diäthyl - dithiocarbamat - methode nach NYDAHL (1939).

Die Sporenkeimteste mit einer *Alternaria tenuis*-Isolierung von *Datura* wurden nach dem Tropfentest von McCallan u. M. (1941) angelegt: eine Sporenaufschwemmung wurde zu Cu - Lösung bzw. gekupfertem Preßsaft gegeben. Nach Umschütteln wurden Tropfen auf Objektträger gebracht, die vorher nach Blumer und Kundert (1951) mit je 6 Paraffinringen versehen waren. Nach 20stündiger Aufstellung bei 21 ° C wurden 100 Sporen je Tropfen unter dem Mikroskop bei Vergrößerung 12 × 12 ausgezählt. Die Auswertung erfolgte nach der Probitanalyse von Finney (1952).

Die biologisch-statistische Auswertung der übrigen Versuche wurde nach Prüfung der Homogenität der Streuungen nach dem Grenzdifferenztest durchgeführt (Linder (1951). Wenn bei Verrechnung von Prozentzahlen Korrelationen zwischen Mittelwert und Streuung auftraten, wurden die Einzelwerte in die entsprechenden arc-sin-x-Werte nach Bliss transformiert (Snedecor 1946).

Es wurden folgende Zeichen verwandt:

$\bar{x}$ = arithmetische Mittel
$\bar{x}$ (%) = arithmetisches Mittel aus %-Werten
$\bar{x}_{(tr)}$ = arithmetisches Mittel aus arc-sin-x-Werten nach Bliss
$s_{\bar{x}}$ = mittlerer Fehler des Mittelwertes
GD_0 = kleinste signifikante Differenz für P = 5 %; 1 %; 0,1 % (GD_5; GD_1; $GD_{0,1}$)

Differenzen mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit (P) von

> 5 % gelten als nicht gesichert
< 5 % gelten als schwach gesichert
< 1 % gelten als gesichert
$< 0{,}1$ % gelten als gut gesichert.

III. Ergebnisse aus Freilandversuchen mit Spontanbefall

Zum Studium der Kupferwirkung auf Pflanzenwuchs und *Phytophthora*befall bei Kraut und Knollen wurden 1953 auf dem institutseigenen Gelände in B o n n und auf dem Versuchsgut der Landwirtschaftskammer Rheinland in W a h n Kupferdüngungsfreilandversuche angelegt. Die ausführliche Versuchsbeschreibung und -begründung sowie die den Pflanzenwuchs und die Krautfäule betreffenden Ergebnisse sind bereits in einer früheren Veröffentlichung niedergelegt (Zeck 1956). Die Versuchsanlage geht aus Abb. 1, die Behandlung der einzelnen Parzellen aus Tabelle 1, Spalte a hervor.

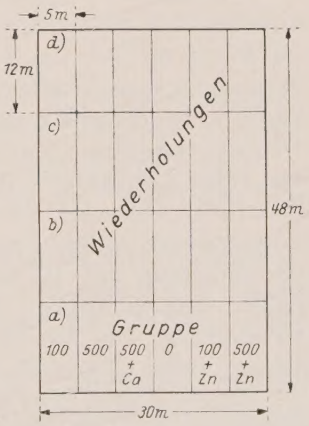


Abb. 1. Lageplan der Freilandversuche

Tabelle 1

Ertrags- und Befallsergebnisse des Kupferdüngungsfreilandversuches in Wahn

Spalte a: Behandlungen[1])
Spalte b: durchschnittliche Erntemengen (kg) von 32 Bestimmungen je Behandlung
Spalte c: durchschnittliche Anzahl fauler Knollen je 10 kg Erntegut (Mittelwerte von 32 Bestimmungen je Behandlung)
Spalte d: *Phytophthora*-Befall des Laubes (Mittelwerte aus 6 × 20 Einzelstaudenbonitierungen je Behandlung)

Gruppe	a Behandlung kg/ha	b Erntemengen $\bar{x}$	b $s_{\bar{x}}$	c Knollenbefall $\bar{x}$	c $s_{\bar{x}}$	d Laubbefall $\bar{x}$	d $s_{\bar{x}}$
0	Unbehandelt	15,15	± 0,366	5,05	± 0,634	42,21	± 1,370
100	100 Cu-sulf.	14,40	± 0,350	3,91	± 0,551	38,99	± 1,075
100 + Zn	100 Cu-sulf. + 50 Zn-sulf.	14,45	± 0,298	3,62	± 0,436	37,96	± 1,541
500	500 Cu-sulf.	11,89	± 0,333	3,14	± 0,494	35,22	± 0,607
500 + Zn	500 Cu-sulf. + 200 Zn-sulf.	11,71	± 0,261	3,30	± 0,478	26,00	± 1,200
600 + Ca	500 Cu-sulf. + 200 Ca-sulf.	11,41	± 0,364	3,26	± 0,534	34,11	± 1,077
		GD_5 = 0,92		GD_5 = 1,46		GD_5 = 3,41	
		GD_1 = 1,22		GD_1 = 1,93		GD_1 = 4,60	
		$GD_{0,1}$ = 1,56		$GD_{0,1}$ = 2,48		$GD_{0,1}$ = 6,09	

[1]) Die niedrige Kupfergabe entspricht der üblichen Aufwandmenge bei Kupfermangelschäden, die höhere wurde in Vorversuchen im Hinblick auf die Pflanzenverträglichkeit als gerade noch vertretbar ermittelt. Für die Zugabe von Calcium und Zink waren in meiner früheren Veröffentlichung behandelte Überlegungen ausschlaggebend, die hier übergangen werden können.

Die am 14. 4. (Bonn) bzw. 15. 4. (Wahn) angelegten Kupferversuche wurden nach Absterben des Krautes am 30. bzw. 29. 9. geerntet. Dabei wurde für jede der 8 Reihen je Einzelparzelle (= 32 Bestimmungen je Behandlung) das Erntegewicht und die Anzahl fauler Knollen ermittelt. In Spalte b der Tabelle 1 sind die Durchschnittsertragszahlen für den Wahner Versuch angegeben. Sie zeigen bei den Kupferparzellen eine deutliche, in der 500er Behandlung statistisch gut gesicherte Abnahme gegenüber der Kontrolle. Um eine Vorstellung vom relativen Anteil fauler Knollen am Erntegewicht zu gewinnen, wurde die Anzahl fauler Knollen einer jeden Einzelmessung auf 10 kg Erntegut umgerechnet. Die Mittelwerte dieser Zahlen sind in Spalte c aufgeführt. Spalte d schließlich zeigt den *Phytophthora*befall des Laubes, der nach einem in meiner früheren Veröffentlichung näher erläuterten Schema ermittelt wurde.

Spalte c zeigt eine gewisse Abnahme der Knollenbefallszahlen in den Kupferparzellen, die aber nur in einigen Fällen und nur schwach gesichert ist. Da außerdem in den Kupferparzellen auf Grund des schwächeren

Laubbefalles (Spalte d) ein geringeres Infektionspotential vorlag, scheint der nur geringe Unterschied in den Befallszahlen nicht für eine Abtötung der Sporen im Boden zu sprechen.

Der Bonner Versuch brachte hinsichtlich Erntemengen und Laubbefall gleichsinnige Ergebnisse. Der Knollenbefall war 1953 jedoch so gering — in der Kontrolle weniger als eine faule Knolle je 10 kg Erntegut —, daß eine Auswertung nicht möglich war.

Um eventuelle Nachwirkungen des Kupfers zu erfassen, wurde die Fläche des Bonner Versuches im folgenden Jahr in derselben Weise abermals mit Kartoffeln bestellt. Da trotz ausschließlicher Längsbearbeitung des Feldes eine gewisse Quervermischung des Bodens z. B. beim Pflügen unvermeidlich war, gelangten nur die 4 mittleren Reihen zur Auswertung. Tabelle 2 zeigt, daß Unterschiede im Ernteertrag nicht mehr auftraten. Zum Vergleich des Knollenbefalls konnten daher die absoluten Befallszahlen ohne Umrechnung auf eine Gewichtseinheit herangezogen werden.

Tabelle 2

Erntezahlen und Knollenbefall
im Kupferdüngungsfreilandversuch Bonn,
ein Jahr nach Behandlung
N = 16

Behandlung	Erntemenge in kg/Reihe		Anzahl faule Knollen je Reihe	
	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
0	24,13	± 0,752	9,63	± 1,644
100	24,94	± 0,708	13,25	± 1,488
100 + Zn	23,35	± 0,512	10,63	± 1,472
500	24,45	± 0,659	10,56	± 1,318
500 + Zn	23,38	± 0,481	11,13	± 1,753
500 + Ca	23,90	± 0,476	11,69	± 1,189
	GD_5 = 1,70		GD_5 = 4,18	
	GD_1 = 2,25		GD_1 = 5,54	
	$GD_{0,1}$ = 2,91		$GD_{0,1}$ = 7,16	

Bei einem mittelstarken Knollenbefall, der, auf Gewicht bezogen, etwa 5 % betrug, zeigten sich nach Tabelle 2 auch im Folgejahr nach der Behandlung keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen.

Für die Wirkungslosigkeit der zum Teil starken Bodenkupferung sind zwei Erklärungen möglich:

1. Der Pilz ist nicht ausschließlich auf den angenommenen Infektionsweg (Konidie vom Blatt durch Regen in den Boden und an die Knollen) angewiesen, er kann auch auf einem anderen Wege in die Knollen vordringen.
2. Der Boden verarmt sehr schnell an fungizid wirksamem Kupfer, sei es durch Auswaschung oder durch Festlegung in unwirksamer Form.

Diese Gesichtspunkte waren Gegenstand weiterer Versuchsabschnitte.

IV. Ergebnisse eines Gefäßversuches mit künstlicher Infektion

Dem Gefäßversuch lagen folgende Überlegungen zugrunde:

1. Der negative Ausgang der Kupferdüngungsfreilandversuche ließ vermuten, daß das Kupfer im Boden nicht mehr in fungizid wirksamer Form vorlag. Verschiedene Autoren haben gezeigt, daß Kupfer in der Natur mannigfachen Inaktivierungsprozessen unterworfen ist. Auch im Boden, einem an Mikrolebewesen, Komplexbildnern und organischer Masse reichen Medium, sind solche Vorgänge denkbar. Daß der Boden, je nach Zusammensetzung und Reaktion, ein unterschiedliches Absorptionsvermögen für Kupfer haben kann, ist bei Untersuchungen über die Ursachen der Heidemoorkrankheit besonders von RADEMACHER (1932, 1936) ausführlich dargelegt worden. Vor allem bestimmte Humusformen sowie Lehm und Ton kommen für die Kupferbindung in Frage. Wenn auf diese Weise eine Inaktivierung des Kupfers im Boden stattfindet, müßte sandiger, wenig absorptionskräftiger Boden die Kupferwirkung in geringerem Maße beeinträchtigen als lehmiger, kolloidreicher Boden.

Die erste Alternative für den Gefäßversuch mit Kupferdüngung war daher lehmiger Boden — sandiger Boden.

2. Nicht nur im Hinblick auf die Kupferwirkung scheint es angebracht, das Ausmaß des Knollenbefalls auf verschiedenen Böden zu prüfen. Schon 1912 hatten JONES u. a. bei künstlicher Infektion von Knollen, die sie in Blumentöpfen vergraben hatten, festgestellt, daß in Lehmboden mehr Befall eintrat als in Sandboden. Auch andere Autoren erwähnen diese Erscheinung, ohne sie erklären zu können.

Die zweite Versuchsfrage lautet also: Hat die Bodenart einen Einfluß auf den Knollenbefall?

3. Die bisher durchgeführten Infektionsversuche an Knollen lieferten, wie bereits dargelegt, recht widerspruchsvolle Ergebnisse. Schon bevor die Arbeit von BOYD u. M. (1953) zugänglich war, in der auf Grund von Infektionen zu verschiedenen Zeitpunkten geernteter Knollen eine fortschreitende Altersresistenz aufgezeigt wurde, glaubte ich, die angedeuteten Widersprüche auf die Außerachtlassung des Reifezustandes der verwendeten Knollen zurückführen zu können. Tastversuche hatten bereits eine Abhängigkeit des Knollenbefalls vom Reifegrad angedeutet.

Die Versuchsanordnung sah daher als weitere Variante mehrere Infektionen im Lauf der Vegetationsperiode vor.

4. Die bisherigen Untersuchungen über die Knolleninfektion erscheinen noch in einer weiteren Beziehung unvollkommen. Sämtliche Versuchsansteller, auch BOYD u. M., arbeiteten mit abgeernteten Knollen. Das bedeutet, daß die Knollen aus ihrem natürlichen Milieu entfernt und in ihrem normalen Reifeprozeß erheblich gestört wurden. Nach VOHWINKEL (1926) besteht zudem die fast nicht zu umgehende Gefahr der Knollenbeschädigung. Schon das Abtrennen der unreifen Knolle vom Stolo stellt eine Verletzung dar. Die Beschädigungsgefahr ist naturgemäß besonders groß bei jungen Knollen, deren Schale äußerst zart und verletzlich ist. Sämtliche hier angedeuteten

Mängel lassen sich m. E. nur mit einer Infektionsmethode vermeiden, die den natürlichen Bedingungen weitestgehend Rechnung trägt, indem sie die Knolle in ihrer natürlichen Lage an der Mutterpflanze erfaßt.

Dementsprechend wurde folgende Versuchsanordnung gewählt:

Zwei Bodenarten:

1. Sandiger Boden: Sandiger Kiesgrubenabraum (Mutterboden) aus dem Norden Bonns mit 11,32 % Abschlämmbarem (Teilchengröße $< 0{,}02$ mm)[1]) und 1,68 % Gesamthumus[2]).
2. Lehmiger Boden: Gemisch aus einem Teil Kompost und zwei Teilen kompostierter Rasenlehm mit 32,42 % Abschlämmbarem[1]) und 3,85 % Gesamthumus[2]).

Zwei Behandlungen:

1. 800 kg/ha Kupfersulfat.
2. Kontrolle (unbehandelt).

Je Bodenart und Behandlung standen 60 Töpfe zur Verfügung.

Düngung:

Als Grunddüngung erhielten je m^3:

der sandige Boden: 1,5 kg schwefelsaures Ammoniak
1,0 kg Superphosphat
1,0 kg Kalimagnesia

der lehmige Boden: 1,0 kg schwefelsaures Ammoniak
1,3 kg Superphosphat
1,0 kg Kalimagnesia.

Diese Düngergaben wurden der Erde vor dem Abfüllen beigemischt.

Die Kupferdüngung wurde am 14. 5., einen Tag vor dem Auslegen der Kartoffeln, als 3 g $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ in 500 ml H_2O je Topf, verabfolgt, entsprechend einem Hektaraufwand von 800 kg, auf Oberfläche berechnet.

Im Anschluß an die Kupferdüngung wurde die Erde sämtlicher Töpfe in einer Tiefe von 10 cm gründlich durchmischt. Die Kontrolltöpfe erhielten 500 ml H_2O.

Gefäße:

Als Gefäße dienten Steintöpfe von 22 cm Durchmesser und einem Füllvolumen von 6 l sowie beiderseitigen Durchlüftungsschächten, die bis in die 3 bis 4 cm dicke Kiesschicht am Boden reichten.

Pflege:

Die Töpfe standen auf Wagen gewöhnlich im Freien, wurden bei Regen in eine bedachte Halle gefahren und bei Bedarf mit Regenwasser begossen.

[1]) Der Feingehalt des Bodens wurde nach der Kühn'schen Schlämmethode bestimmt. Arbeitsgang in Abderhalden, Hdb. der biol. Arbeitsmethoden, Abt. III, Teil 3, S. 267 f.

[2]) Die Gesamthumusbestimmung wurde nach der Methode von Rauterberg und Kremkus (1951) im Institut für Agrikulturchemie der Universität Bonn durchgeführt.

Infektionen:

Vier Infektionstermine wurden über die ganze Vegetationsperiode verteilt. Von jeder Boden- und Behandlungsart wurden jeweils 10 Töpfe infiziert. Die restlichen 20 Töpfe je Versuchseinheit verblieben als Kontrolle (s. u.) und als Reserve.

1. Am 15. 7., als die Stauden voll entfaltet und mit erbsen- bis walnußgroßen Knollen hinreichend besetzt waren.
2. Am 7. 8., als die Stauden zu vergilben begannen.
3. Am 30. 8., als die Masse des Laubes vergilbt oder abgestorben war.
4. Am 9. 10., nachdem die Knollen nach Absterben des Krautes etwa 4 Wochen in der Erde gelagert hatten.

Infektionsmethode:

Das Pilzmaterial entstammte einer 1953 vorgenommenen Isolierung von befallenen Kartoffelblättern der Sorte Bona. Der Pilz wurde seitdem bei wöchentlichen Überimpfungen auf halbierten Kartoffeln in feuchten Schalen gehalten. Einige Tage vor jedem Infektionstermin wurde die Schnittfläche von etwa 15 halbierten Knollen mit Sporenaufschwemmung beimpft. In 6 Tagen war reichlich sporulierendes Myzel gebildet. Die Myzelflocken wurden mit einer Lanzettnadel von der Knollenschnittfläche abgehoben und in destilliertem Wasser ausgeschwenkt. Auf diese Weise wurden 5 l Sporensuspension mit einer Dichte von 4000—5000 Sporen je ml hergestellt. Zum Zeitpunkt des Impfens, etwa 1—1½ Stunden nach Ansetzen der Suspension, hatte regelmäßig ein Teil der Sporangien Zoosporen entlassen. Damit der Boden bei der Infektion gut durchfeuchtet war, wie es im Freiland bei natürlichen Infektionen wohl auch der Fall sein wird, wurde jeder Topf 2 Stunden vorher mit ½ l Regenwasser begossen. Dadurch wurde auch erreicht, daß die Infektionslösung — 100 ml je Topf — sich besser verteilte und gleichmäßig in den Boden einzog. Während des Infizierens wurde die Impflösung ständig aufgerührt. Zur Kontrolle eines möglichen Spontanbefalls wurden jedesmal zwei Töpfe je Bodenart und Behandlung mit 100 ml aqua dest. begossen.

Auswertung:

15 Tage nach der Infektion wurden die behandelten Stauden einzeln geerntet. Nachdem das Erntegut eines jeden Topfes unter fließendem warmem Wasser und leichtem Abreiben von anhaftender Erde gesäubert war, wurde von jedem Topf festgestellt:

a) Zahl und Gewicht sämtlicher Knollen,
b) Zahl und Gewicht der erkrankten Knollen,
c) nach Möglichkeit die Eintrittsstellen des Pilzes bei den erkrankten Knollen.

Ergebnisse:

Die Ertragsauswertung ist bereits in meiner früheren Arbeit veröffentlicht. Zur Orientierung über die Ertragsverhältnisse sind in folgender Über-

sicht die Durchschnittszahlen aus sämtlichen Gruppen eines jeden Termines aufgeführt. Knollen mit einem Gewicht von weniger als 1 g wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

	∅ Knollenzahl je Topf	∅ Erntegewicht je Topf g	∅ Gewicht der Einzelknolle g
1. Termin	26,0	326,7	12,6
2. Termin	26,7	431,9	16,1
3. Termin	23,8	424,1	17,8
4. Termin	25,7	428,4	16,6

Die Pflanzen lieferten also sehr gute, an den 3 letzten Terminen annähernd gleichhohe Erträge.

Die Befallsergebnisse zeigt Tabelle 3. Die statistische Auswertung wurde mit den nach arc-sin-x transformierten %-Zahlen der befallenen Knollen für jeden Boden einzeln durchgeführt.

Da im Sandboden in 3 Gruppen kein Befall auftrat, wurde die Grenzdifferenz hier nur von den 5 übrigen Gruppen gebildet. Mit den $\bar{x}_{\%}$-Werten ist der Befall in Abbildung 2 auch bildlich dargestellt.

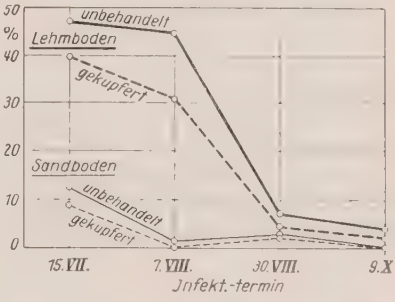


Abb. 2. Graphische Darstellung der $\bar{x}_{\%}$-Werte aus Tabelle 3

Tabelle 3

Knollenbefall in einem Gefäßversuch nach Begießen des Bodens mit Sporensuspension an verschiedenen Terminen während der Vegetationszeit

O = unbehandelt
Cu = gedüngt mit 800 kg/ha Cu-Sulfat
N = 10

	Lehmboden						Sandboden					
	O			Cu			O			Cu		
	$\bar{x}_{\%}$	$\bar{x}_{tr}$	$s_{\bar{x}tr}$	$\bar{x}_{\%}$	$\bar{x}_{tr}$	$s_{\bar{x}tr}$	$\bar{x}_{\%}$	$\bar{x}_{tr}$	$s_{\bar{x}tr}$	$\bar{x}_{\%}$	$\bar{x}_{tr}$	$s_{\bar{x}tr}$
1. Termin	46,7	43,04	±2,26	39,8	39,00	±1,89	12,5	19,38	±1,75	8,7	16,23	±1,33
2. Termin	44,3	41,63	±1,96	30,9	33,40	±2,45	0,82	2,86	±1,46	0	0	—
3. Termin	6,61	13,93	±1,80	4,23	9,77	±2,29	2,46	6,29	±2,18	2,27	4,74	±2,45
4. Termin	3,40	7,39	±2,59	1,52	3,77	±2,02	0	0	—	0	0	—
	$GD_5 = 6,13$						$GD_5 = 5,35$					
	$GD_1 = 8,14$						$GD_1 = 7,16$					
	$GD_{0,1} = 10,55$						$GD_{0,1} = 9,36$					

Aus den ermittelten Zahlenwerten ergibt sich folgendes:

1. Mit zunehmender Reife sinkt der Befall stark ab. 40—50%igem Befall an den beiden frühen Terminen im Lehmboden stehen nur wenige Befallsprozente an den letzten Terminen gegenüber.
2. Im Lehmboden treten wesentlich höhere Befallszahlen auf als im Sandboden. Besonders bei den früheren Terminen ist der Befall im Lehmboden ein Vielfaches von dem im Sandboden.
3. Die Kupferung hatte bei beiden Böden nur einen geringen Einfluß auf den Befallsgrad. Nur in einem Fall (Lehmboden, 2. Termin) liegt der Wert für „gekupfert" mit $P < 5\%$ schwach gesichert unter dem Kontrollwert.

Die qualitative Befallsauswertung erbrachte folgendes:

1. Ein kleiner Anteil Knollen war deutlich vom Nabelende her befallen.
2. Bei einem größeren Anteil war die Infektion offensichtlich von den Augen ausgegangen.
3. An den ersten Terminen und vor allem im Lehmboden schien ein Großteil der Infektionen an den Lentizellen ihren Ursprung genommen zu haben.

Es fiel ferner auf, daß die Lentizellen der Knollen aus dem Lehmboden besonders an den beiden ersten Terminen zum Teil stark gewuchert waren.

Die Ergebnisse dieses Gefäßversuches, vor allem auch die schon von Löhnis (1922) angeschnittene Frage nach der ursächlichen Bedeutung der Lentizellenwucherungen für die Infektion, lösten eine Reihe weiterer Untersuchungen über die Infektionsverhältnisse an der Knolle aus, die in den folgenden Abschnitten behandelt werden.

V. Infektionsmodus der Knollen

a) Der Infektionsweg

Die einleitend zitierte Literatur über die Infektionsverhältnisse vermittelt keine klare Vorstellung vom Infektionsweg. Bei der Auswertung der eigenen Freilandversuche wurde die Möglichkeit des Hyphenwachstums durch Stengel und Stolo bis in die Knolle hinein in Erwägung gezogen. Die Gefäßversuche zeigten andererseits, daß eine Infektion vom Boden her unter bestimmten Umständen sehr gut gelingt. Folgende Untersuchungen sollten daher zur Klärung der Verhältnisse beitragen.

1. Freilanduntersuchungen

In einem mit Kupfer nicht gespritzten oder gedüngten Kontrollstreifen des schon beschriebenen Feldversuches wurden am 16. 7. 1954 sämtliche Stengel von je 10 Stauden in 5—10 cm Höhe durch Einstich mit einer

Lanzettnadel und Einbringen von Myzel folgender 4 *Phytophthora*rassen bzw. -herkünfte beeimpft:

1. *Phytophthora*rasse A (Schaper)
2. *Phytophthora*rasse B (Schaper)
3. Einsporkultur von Freilandisolierung des Jahres 1953
4. Befallene Blattstückchen von kurz vorher gepflückten Blättern aus der Versuchsparzelle.

5 Kontrollstauden wurden nur mit der Nadel verletzt.

Ergebnis:

Nach 3 Tagen: Keine Symptome.

Nach 5 Tagen: An den Infektionsstellen der 1. und 3. Behandlung zeigen sich Bräunungen von etwa 1 cm Ausdehnung nach oben und unten, die Infektionsstellen der 4. Behandlung sind nur unmittelbar um die Einstichstellen gebräunt.

Nach 14 Tagen: Bei allen 4 Herkünften haben sich schmale Stengelpartien von der Infektionsstelle aus nach oben und unten in einer Ausdehnung von etwa 5 cm gebräunt; nur selten gingen diese Streifen über den nächsten Knoten hinaus. Solange es der Zustand der Stauden erlaubte, wurden die Triebe auch weiterhin kontrolliert. Die verbräunten Streifen dehnten sich noch etwas aus; die Knoten bildeten aber auch weiterhin starke Hindernisse. In keinem Fall erreichte sichtbar befallenes Gewebe die Bodenoberfläche. Die Kontrolleinstiche heilten sehr schnell aus und waren nach 2 Wochen kaum mehr sichtbar.

2. Wasserkulturversuch

20 Augenstecklingspflanzen wurden in Wasserkultur herangezogen. Die dabei verwendete Methode nach Kopetz u. M. (1949) erwies sich als sehr zweckmäßig, da die Stolonen und Kartoffeln in der Kiesschicht der als Abdeckung dienenden, durchlöcherten Tonschalen gebildet wurden und daher durch Entfernen (Abkippen) des Kieses jederzeit ohne Beschädigungsgefahr für die Pflanzen beobachtet werden konnten (Abb. 12). Durch Aufstellung im Gewächshaus war außerdem die Möglichkeit einer Spontaninfektion unterbunden. Etwa 6 Wochen alte Pflanzen wurden 3 bzw. 10 cm über der Kiesoberfläche, wie bei den Freilandversuchen beschrieben, infiziert. Ständige Kontrollen zeigten, daß auch hier an den Knoten das Pilzwachstum stockte oder erst nach längerer Verzögerung über diese hinauswuchs. Im „unterirdischen", etwas verholzten Teil des Stengels war das Wachstum besonders schleppend. An der Stengelbasis kam es völlig zum Stillstand; die Stolonen blieben immer befallsfrei.

3. Topfversuch

Je 20 Kartoffeltopfpflanzen (Sorte Bona) wurden im Alter von 11 oder 7 Wochen im Gewächshaus mit *Phytophthora* infiziert

a) durch Begießen des Bodens mit je 100 ccm Sporangien — Zoosporen — Suspension, Dichte 3000 Sporen/ccm,

b) durch Myzelflocken, die etwa 5 cm über dem Boden mittels Lanzettnadel in den Stengel eingeführt wurden.

Ergebnis: Bei den jüngeren, durch Einstich infizierten Kartoffelpflanzen breitete sich das Myzel langsamer aus als bei den älteren. An den Knoten stockte das Pilzwachstum zeitweilig. 4 Wochen nach der Infektion wurden die Pflanzen geerntet. Bei den mit Einstich infizierten Pflanzen war kein Knollenbefall feststellbar; die Knollen der mit Suspension infizierten Pflanzen waren zu durchschnittlich 80 % erkrankt. Auch in weiteren, hier nicht näher ausgeführten Versuchen war niemals zu beobachten, daß Myzel nach Infektion von Triebteilen bis in den Stolo oder gar in die Knolle wuchs. Die Tatsache, daß es andererseits keine Schwierigkeiten machte, durch Begießen des Bodens mit Suspension bis zu 80 % der Knollen zu infizieren, läßt demnach den Schluß zu, daß auch unter Freilandbedingungen in der Hauptsache Knolleninfektionen nur von in den Boden geschwemmten Sporangien oder Zoosporen verursacht werden.

Die Wirkungslosigkeit der Bodenkupferung im oben beschriebenen Freilandversuch muß daher auf einem Verlust der fungiziden Eigenschaften des dem Boden zugeführten Kupfers beruhen.

b) Ort des Eindringens

Zunächst wurde versucht, auf folgende Fragen eine Antwort zu finden:

1. An welchen Stellen der Knolle ist eine Infektion möglich?
2. Wo tritt die Infektion besonders häufig auf?
3. Wie lange muß Infektionsmilieu herrschen, damit eine Knolle erkrankt?

Hierzu dienten folgende Versuche:

1. Versuch:

Zwei etwa 3 Monate alte, noch in vollem Wachstum stehende Kartoffeltopfpflanzen wurden vorsichtig aus den Töpfen gehoben und durch leichtes Hin- und Herschwenken unter Wasser von anhaftender Erde befreit. Jede Berührung oder Beschädigung der Knollen, die sämtlich durch die Stolonen noch mit der Mutterpflanze verbunden waren, wurde vermieden. Nach zweimaligem Nachspülen in Regenwasser wurden die „unterirdischen" Pflanzenteile, also die Wurzeln, die Stolonen mit den daran hängenden Knollen (10 Stück je Pflanze) und der unterste Teil des Sprosses, in einer Mitscherlichschale in Sporensuspension getaucht (Dichte ca. 3000 Sporen je ccm) und 8 Std. darin belassen. Im Anschluß daran wurden die Pflanzenteile in trockene Schalen übertragen, die mit einer zweiten Schale abgedeckt wurden.

Nach einer Woche bot sich folgendes Bild: Sämtliche Knollen waren zumeist mit vielen Infektionsstellen behaftet. Ein Teil der Infektionen ging von den Augen aus, in vielen Fällen waren offenbar die Lentizellen die Eintrittsstellen, in einigen Fällen war auch die Nabelpartie bevorzugt befallen.

Ein weiterer Versuch in derselben Art mit den unterirdischen Teilen von 5 Pflanzen brachte das gleiche Ergebnis: Sämtliche Knollen waren bedeckt von Infektionsstellen, die teilweise von den Augen ausgingen, teilweise auf Lentizellen zurückzugehen schienen oder sich um die Nabelpartie scharten.

2. Versuch:

Abgereifte Kartoffelstauden aus dem Versuchsgarten wurden sehr behutsam von Hand geerntet und zum Austrocknen und zur Kontrolle auf natürlichen Befall 14 Tage lang auf Tüchern ausgebreitet. 48 etwa gleichgroße, gesunde und unbeschädigte Knollen wurden ausgesucht und zu je 12 in Mitscherlichschalen, wie oben beschrieben, infiziert. Die Knollen aus 2 Schalen wurden nach 5 Stunden, die übrigen nach 24 Stunden aus der Suspension genommen, unter fließendem Wasser abgespült und in bedeckten Schalen aufgestellt. Von der Partie, die 5 Stunden in Impflösung gelegen hatte, waren nach 7 Tagen 8 Knollen vornehmlich von den Augen her, in 2 Fällen auch vom Nabel her erkrankt. Bis auf 2 offensichtliche Beschädigungen waren an den übrigen Stellen keine Infektionen angegangen. Die 24 Stunden in Impflösung gelegenen Kartoffeln waren dagegen größtenteils bakterienfaul und ließen eine Auswertung auf *Phytophthora*befall nicht mehr zu.

Als methodische Voraussetzung für Folgeversuche sollte ein dritter Versuch zeigen, wie lange Infektionsmilieu herrschen muß, damit eine Infektion zum Haften kommt, Bakterienfäulnis aber ausgeschlossen bleibt.

3. Versuch:

Von dem schon zum vorhergehenden Versuch verwendeten Erntegut (Bona) wurden am 2. Oktober, drei Wochen nach der Ernte, 100 gleichmäßige, mittelgroße und einwandfreie Kartoffeln ausgesucht und zu je 15 in Mitscherlichschalen, wie bereits beschrieben, zur Infektion eingelegt. Nun wurden im Abstand von 1, 3, 5, 10 und 20 Stunden jeweils 20 Knollen aus verschiedenen Schalen entnommen und unter fließendem Wasser kräftig abgespült. Um etwa äußerlich anhaftende, noch nicht eingedrungene Sporen abzutöten, wurden die Knollen anschließend 5 Minuten lang im Trocken-

Tabelle 4

Einfluß der Impfdauer auf den Infektionserfolg

Einwirkungszeit der Suspension	Prozentualer Befall von 20 Knollen	Anzahl Infektionsstellen von 20 Knollen			
		an Augen	an Lentizellen	am Nabel	insgesamt
	a	b	c	d	e
1 Stunde	0	—	—	—	0
3 Stunden	45	12	2	—	14
5 Stunden	80	26	1	2	29
10 Stunden	90	47	11	2	60
20 Stunden	100	57	8	2	67

schrank einem Luftstrom von 32° C und 35—40% RF ausgesetzt. Anschließend kamen die Knollen in trockene Mitscherlichschalen, die gut abgedichtet wurden. Vom 4. Tage ab wurden die Knollen täglich auf Befall kontrolliert. Befallsverdächtige Stellen wurden sofort markiert, so daß noch nach Tagen, wenn die Flecken sich unregelmäßig verbreitert hatten oder ineinander übergelaufen waren, die Ursprungsstelle angegeben werden konnte. Nach 10 Tagen hatte sich der Befall „voll entwickelt". In Tabelle 4 wurde vermerkt: In Spalte a) der Prozentsatz der befallenen Knollen von den 20 je Gruppe, in den Spalten b), c) und d) die Anzahl Befallsstellen an Augen bzw. Lentizellen bzw. Nabel von allen 20 Knollen einer Gruppe, und in Spalte e) die Summe von b), c) und d).

Ein Wiederholungsversuch in derselben Aufmachung brachte im Prinzip das gleiche Ergebnis. Es wurde also deutlich, daß bei abgereiften Knollen

1. zur Erzielung von 100%igem Befall 15—20 Stunden Infektionsmilieu herrschen muß,
2. die Infektion zur Hauptsache an den Augen stattfindet,
3. der Befall am Nabel nur sehr gering ist,
4. auch an Lentizellen nur wenig Befall eintrittt. Wenn man bedenkt, daß die Anzahl der Lentizellen an der Knolle ein Vielfaches (etwa 10—50faches) der Augen darstellt, so kann man von einem nennenswerten Befall an den Lentizellen erst bei einer Einwirkungszeit von 10 Stunden und mehr sprechen.

In Abbildung 3 ist das typische Bild einer Lentizelleninfektion wiedergegeben. Um sicher zu gehen, wurde beim Verdacht auf Lentizelleninfektion stets mit dem Binokular bei 30-facher Vergrößerung untersucht, ob auch keine Verletzung der Schale vorlag. In der Abbildung ist die Schale der besseren Deutlichkeit wegen entfernt.

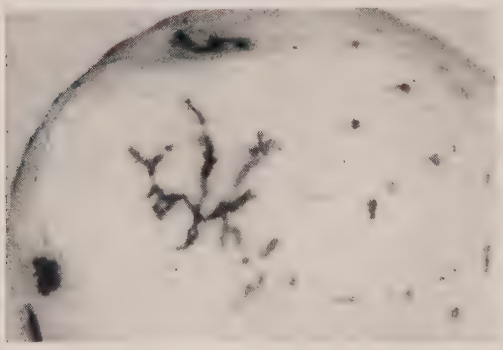


Abb. 3. Lentizellenbefall an reifer, abgelagerter Knolle nach künstlicher Infektion

Es interessiert nunmehr, wie sich das Befallsbild gestaltet, wenn nicht reife, abgelagerte Knollen verwendet werden, sondern unreife Knollen an der Mutterpflanze und Knollen mit Lentizellenwucherungen. Die erste Frage ist Gegenstand des nächstfolgenden Kapitels; um die Bedeutung der Lentizellenwucherungen für die Infizierbarkeit der Knolle zu ermessen, mußten zunächst die Voraussetzungen ihrer Entstehung methodisch geklärt werden.

Es sei kurz daran erinnert, daß Lentizellen die Atemöffnungen der wachsenden Knolle sind und angelegt werden, wenn etwa im erbsengroßen Stadium die Peridermbildung einsetzt (ESMARCH 1920). Bei großer Feuch-

tigkeit werden auf ihnen kleine Anhäufungen weißer oder hyaliner, großlumiger und locker gelagerter Zellen sichtbar, die sogenannten Lentizellenwucherungen. Sie wurden erstmals von De Vries im Jahre 1878 beschrieben und sollen dort auftreten, wo die normale Atmung gestört ist. Luft- und Sauerstoffmangel allein genügen nach Killian (1920) noch nicht zu ihrer Ausbildung; es müssen nach Schilling (1915) innere Vorbedingungen (Anhäufung von intramolekularen Stoffwechselprodukten) und äußere Vorbedingungen (feuchte Atmosphäre) gegeben sein. In dem Maß, wie das Lentizellenkambium mit zunehmendem Alter verkorkt, soll nach Longrée (1932) die Fähigkeit zur Wucherung nachlassen.

Der Bau der Lentizellen und damit auch das Wucherungsvermögen ist nach Schilling (1915) und Noll (1940) sortenverschieden. Lutman (1913) macht die sortentypische Ausbildung der Lentizellen für die unterschiedliche Schorfanfälligkeit verantwortlich. Nach Riehm (1928) spielt die Beschaffenheit der Lentizellen auch für die Widerstandsfähigkeit gegen *Phytophthora* eine Rolle, wenn auch nur eine bedingte, da auch die Augen als Eintrittspforte dienen. Löhnis (1923) dagegen führt den Grad des Knollenbefalls hauptsächlich auf die Unterschiede in der Ausbildung der Lentizellen zurück und betont die wesentliche Bedeutung, die hierbei die einzelnen Bodenarten mit ihrem unterschiedlichen Wasserhaltevermögen haben.

In den eigenen Versuchen über die Bedingungen der Lentizellenwucherungen wurde daher gefragt nach der Bedeutung

1. des Mediums,
2. von Alter und Zustand der Knolle,
3. der Sortenzugehörigkeit.

1. Das Medium

100 % Luftfeuchte führte während einer 3monatigen Lagerung zu keiner Reaktion bei abgereiften Knollen.

In stehendem und fließendem Wasser faulten die Knollen im Laufe von 8 Tagen, ehe Wucherungen eintraten.

In feuchtem Quarzsand, den Killian (1920) und Klaus (1941) mit Erfolg benutzten, erschienen zwar nach einigen Wochen die ersten Wucherungen, der Anteil an bakterienfaulen Knollen, auch wenn Sand und Knollen vorher sterilisiert wurden, war aber sehr hoch. Das gleiche gilt für Gartenerde.

In Torfmull, der vor Verwendung 2 Stunden bei $1^1/_2$ atü im Autoklaven sterilisiert und später ständig feucht gehalten wurde, entstanden bei Verwendung von abgereiften Knollen nach 4 bis 6 Wochen große Wucherungen. Die Temperatur spielte aber eine wichtige Rolle: Bei 26 ° C faulten die Knollen auch hier bald; bei 21 ° C bildeten sich zwar am schnellsten einige Wucherungen, die Knollen fielen aber ebenfalls sehr schnell der Bakterienfäulnis zum Opfer. 16 ° C war eine sehr günstige Temperatur, bei der auch nach mehrmonatiger Lagerung kaum Fäulnis auftrat. Noch sicherer

war eine Temperatur von 11 ° C, bei der die Wucherungen jedoch eine längere Entwicklungszeit brauchten. Sie konnten bei dieser Temperatur aber monatelang frisch und weiter wachsend gehalten werden.

Abbildung 4 zeigt eine Bona-Knolle nach 6 Wochen Lagerung in feuchtem Torfmull bei 16 ° C.

2. Alter und Zustand der Knolle

Wurden statt abgereifter Knollen junge, unreife genommen, so waren im feuchten Torfmull bei 16 ° C bereits nach einer Woche deutliche Lentizellenwucherungen vorhanden. Noch stärker war die Wucherungsintensität, wenn Knollen an der lebenden Pflanze zum Wuchern exponiert wurden. So wucherten die Lentizellen von Knollen, die, durch den Stolo noch mit der Mutterpflanze verbunden, freigelegt und in Wasser untergetaucht wurden, schon nach wenigen Tagen. Ältere Knollen werden unter diesen Umständen sehr bald bakterienfaul.

Abbildung 5 zeigt zwei Knollen an einer Wasserkulturpflanze. Die linke blieb unbehandelt, die rechte wurde in ein Schälchen mit Wasser eingelegt. Die Aufnahme wurde nach 4tägiger Versuchsdauer gemacht. Selbst feuchte Luft genügt schon zur Ausbildung von Wucherungen bei wachsendem Knollengewebe.

Auch Beschädigungen der Knolle wirken sich günstig auf das Wucherungsvermögen aus. Waren bei unbeschädigten abgelagerten Knollen nach 6 Wochen die ersten Wucherungen sichtbar (16 ° C, feuchter Torfmull), so war dies bei Knollen, denen mit einem Korkbohrer eine 1 cm dicke Säule der Länge nach ausgestochen war, bereits nach 3 Wochen der Fall, und bei halbierten Knollen sogar schon nach 10—14 Tagen.

Eine Knolle, die einen Monat nach der Ernte halbiert und 3 Wochen in feuchtem Torfmull bei 16 ° C eingelegt wurde, zeigte deutliche Lentizellenwucherungen und beginnende Keimung.

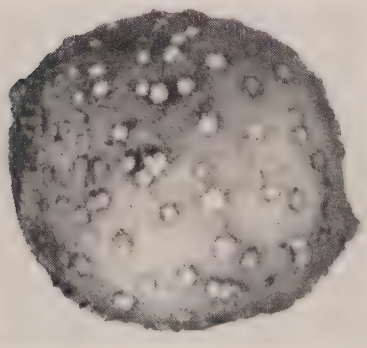


Abb. 4

Abb. 5. Erklärung siehe Text

Auch bei den Versuchen mit ganzen Knollen war das Wuchern der Lentizellen regelmäßig mit dem Keimungsbeginn verknüpft.

3. Sortenzugehörigkeit

Der normale „Entstehungstyp" der Lentizellenwucherungen kann an Hand der Abbildungen 6 und 7 wie folgt geschildert werden:

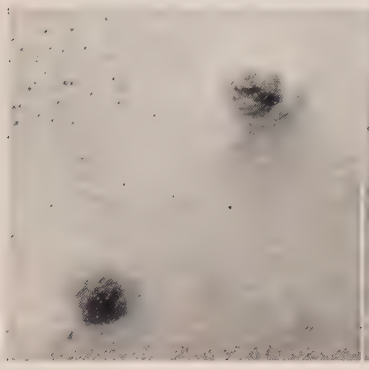


Abb. 6. Erklärung siehe Text

Abb. 7. Erklärung siehe Text

Zunächst schwillt die Umgebung der Lentizellen etwas an. Abgestorbene Füllzellen bilden dann eine dunkle Kappe auf einer kleinen Erhöhung (Abb. 6 links), die schließlich aufplatzt und das dunkle „Hütchen" zur Seite drückt (Abb. 6 rechts, Abb. 7). Das weiße Wucherungsgewebe kommt dann zum Vorschein und kann die ursprüngliche Lentizelle nach allen Seiten beträchtlich überwuchern. Der Wucherungsprozeß braucht nicht auf die Lentizellen beschränkt zu bleiben. Wie Abb. 7 rechts zeigt, können zwei nebeneinander liegende Lentizellen durch „Wucherungsspalten" miteinander verbunden werden.

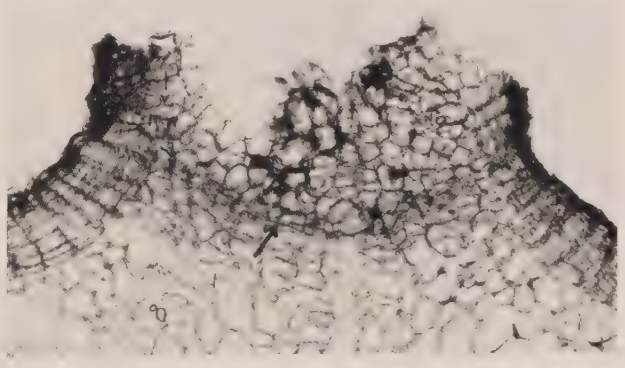


Abb. 8. Querschnitt durch eine Lentizellenwucherung

Den histologischen Aufbau einer Lentizellenwucherung läßt Abb. 8, die Mikroaufnahme eines Querschnittes durch eine gewucherte Lentizelle, erkennen: Die konkave Lagerung der Zellschichten und bei ↗ auch das Lentizellenkambium.

Von folgenden 27 Kartoffelsorten aus allen Reifungsgruppen wurden nun jeweils 10 ganze und 10 halbe Knollen in sterilem, feuchtem Torfmull bei 16 ° C aufgestellt und wöchentlich auf Lentizellenwucherungen bonitiert.

A. sehr früh reifend:	Erstling
B. früh reifend:	Forelle Frühperle Sieglinde Sommerkrone
Ca. mittelfrühe Speisesorten:	Bona Concordia Jacobi Olympia Suevia Tempo
Cb. mittelfrühe Speise- und Wirtschaftssorten:	Augusta
Da. mittelspät — spät reifende Speisesorten:	Delta Erdgold Heida Hilla Wiga
Db. mittelspät — spät reifende Speise- und Wirtschaftssorten:	Ackersegen Aquila Benedicta Capella Carmen Fortuna Heimkehr Oda
Dc. mittelspät — spät reifende Wirtschaftssorten:	Adelheid Robusta

Es zeigte sich, daß fast alle Sorten etwa in der gleichen Zeit und im selben Ausmaß mit Lentizellenwucherungen reagierten, nur „Oda“ und „Olympia“ waren etwas träger, und das Symptombild bei „Frühperle“ und „Adelheid“ war etwas abweichend. Es kam fast kein Wucherungsgewebe zum Vorschein; die starken länglichen Anschwellungen sprangen nur mit einem feinen Riß der Länge nach auf.

In den Abbildungen 9 und 10 sind zwei besonders charakteristische Typen dieses Sortenversuches veranschaulicht. Die Aufnahmen wurden alle am 24. Tage nach Versuchsbeginn von halben Knollen gemacht.

Grundlegende Unterschiede im Sortenverhalten waren daher nicht zu erwarten.

Abb. 9. „Bona“, spaltenförmige Wucherungen

Abb. 10. „Frühperle“, starke Wölbungen mit Riß

Nachdem so hinlänglich Klarheit über die Bedingungen der Lentizellenwucherung geschaffen war, wurden die Knollen für die Infektionsversuche nach folgender Methode zum Wuchern angesetzt: Je 10 Knollen wurden in Mitscherlichschalen in sterilen Torfmull eingebettet und in der Klimakammer bei 16 ° C aufgestellt. Die Schalen wurden regelmäßig dergestalt mit Wasser versorgt, daß alle Flüssigkeit gut aufgesogen werden konnte. Mehrfach wurden je 10 normale und gewucherte Knollen, wie oben beschrieben, 15 Stunden lang in Sporensuspension eingelegt, anschließend 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgespült und in abgedeckten Schalen gehalten.

Nach 5 bzw. 8 Tagen wurde der Befall nach folgendem Schema bonitiert:

0 = kein Befall,
1 = einzelne Befallsstellen an Augen,
2 = Augen befallen und bis zu 5 Lentizellen,
3 = Augen befallen und bis zu 10 Lentizellen,
4 = etwa $^1/_4$ aller Lentizellen befallen,
5 = etwa $^1/_2$ aller Lentizellen befallen,
6 = etwa $^3/_4$ aller Lentizellen befallen,
7 = alle Lentizellen befallen.

Bei sämtlichen Versuchen dieser Art lagen die Bonitierungszahlen der gewucherten Knollen je nach Wucherungsgrad zwischen 4 und 7, der Befall der nicht gewucherten Knollen ging dagegen selten über die Bonitierungsstufe 2 hinaus.

Abbildung 11 zeigt 2 Knollen eines solchen Versuches, die sich im Befallsbild deutlich unterscheiden: Die Kontrollknolle (links) weist kompakte Befallsflächen auf, die in den Augen ihren Ursprung haben; der Befall an der gewucherten Knolle (rechts) löst sich in zahlreiche Einzelinfektionen an den Lentizellen auf.

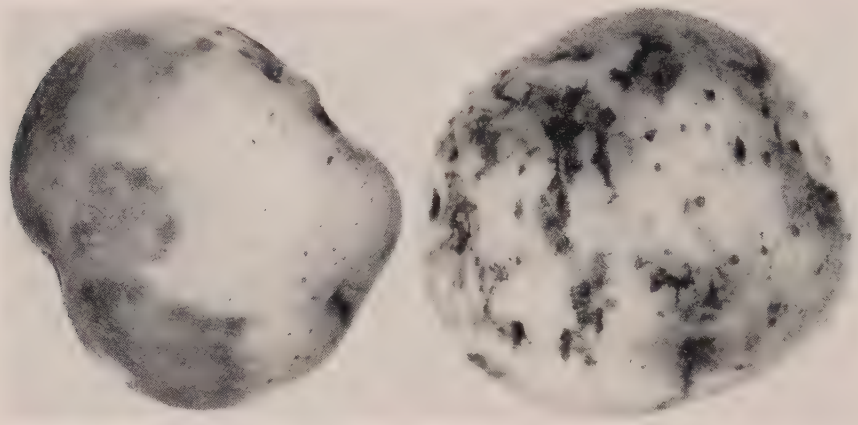


Abb. 11. *Phytophthora*-befallene Kartoffelknollen. Links: Normale Knolle, 14 Tage nach Infektion. Rechts: Knolle mit Lentizellenwucherungen, 8 Tage nach Infektion

Die letzte in diesem Versuchsabschnitt zu klärende Frage war die Anfälligkeit des Stolos. Als Material dienten wieder Wasserkulturpflanzen, deren Stolonensystem zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung durch Abkippen der Kiesdeckschicht ohne Störung des Wachstums zugänglich war. Abbildung 12 zeigt den Tonteller eines Wasserkulturgefäßes mit den freigelegten Stolonen und Knollen.

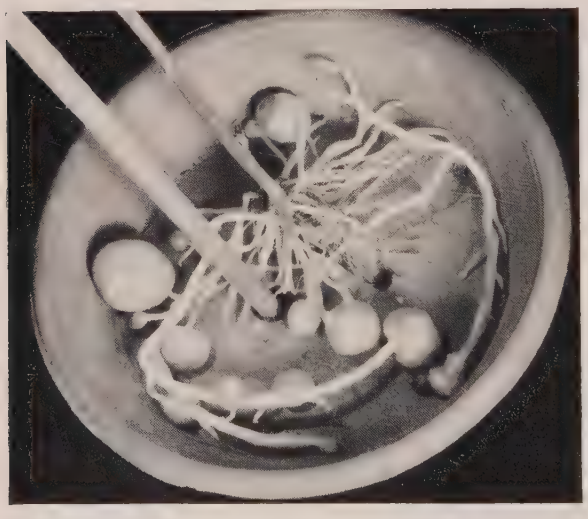


Abb. 12. Freigelegtes Stolonensystem einer Wasserkulturpflanze

Zunächst wurden die Stolonen einer Pflanze, 3—7 cm von den fast haselnußgroßen Knollen entfernt, mit einer Injektionsspritze und Zoosporen-Suspension infiziert. Schon in wenigen Tagen hatte der Pilz die Stolonen durchwachsen und war in die Knollen eingedrungen.

Von einer im Freien auf einem Kompost-

haufen wachsenden Kartoffelpflanze wurden vorsichtig einige Stolonen freigelegt und in 10 cm Entfernung von den etwa 3 cm dicken Knollen mit Zoosporen-Suspension injiziert. Nach 10—12 Tagen hatte das Myzel den gesamten Stoloabschnitt bis zur Knolle überwunden und diese zum Erkranken gebracht.

Die Ausbreitung des Myzels war im Stolo also nicht behindert.

Ein weiterer Versuch gab Auskunft über das Verhalten des unverletzten Stolos.

Nach Abschütten der Kiesdeckschicht von fünf Wasserkulturpflanzen wurden die hasel- bis walnußgroßen Knollen und die letzten 1—2 cm der Stolonen mit Papier abgedeckt und das verbleibende Stolonensystem mit gut schwärmender Zoosporen-Suspension sprühinfiziert. In die Tonschale wurde sodann ein feuchter Wattebausch gelegt und die Schale mit dunklem Papier abgedeckt. Schon nach 3 Tagen waren zahlreiche kleine braune Punkte an den Stolonen zu sehen, nach weiteren 2 Tagen waren die ganzen Stolonen streifig braun gefärbt, und die Knollen begannen vom Nabel her zu erkranken. Eine Woche nach Versuchsbeginn waren sämtliche Knollen befallen.

Demnach ist das Eindringen der *Phytophthora* auch in unverletzte Stolonen ohne weiteres möglich.

c) Altersabhängigkeit der Infektion

Der in Abb. 2 veranschaulichte Gefäßversuch zeigte bereits, daß der Knollenbefall mit zunehmender Reife stark abnimmt. Zu demselben Ergebnis führten auch die auf den Seiten 244 und 245 wiedergegebenen Infektionsversuche mit wachsenden und abgereiften Kartoffelknollen. Wasserkulturversuche sollten diese Erkenntnis bestätigen. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse von 2 Infektionsversuchen an Wasserkulturkartoffeln zusammengestellt, bei denen zur gleichen Zeit und in derselben Sporensuspension sowohl abgereifte

Tabelle 5

Infektion von jungen und abgereiften Kartoffelknollen

Versuch A

	von 10 Knollen waren befallen		
	an Augen	an Lentizellen	insgesamt
Junge Knollen	?	10	10
Abgereifte Knollen	1	—	1

Versuch B

	von 25 Knollen waren befallen		
	mit wenigen Befallsstellen	mit vielen Befallsstellen	insgesamt
Junge Knollen	4	21	25
Abgereifte Knollen	6	—	6

Knollen wie auch unmittelbar vorher von der wachsenden Mutterpflanze abgetrennte Knollen infiziert wurden (Impfdauer 15 Stunden).

Die Zahlen zeigen eindeutig, daß die jungen Knollen wesentlich anfälliger sind. Der vereinzelte Befall bei den alten Knollen trat an den Augen ein, während die unreifen Knollen an der ganzen Oberfläche viele Lentizelleninfektionen aufwiesen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über die Anfälligkeit der Knolle können wie folgt zusammengefaßt werden:

Abgereifte, unbeschädigte Knollen werden nur vereinzelt an den Augen befallen. Nur bei länger einwirkendem Infektionsmilieu treten einige, beim Vorliegen von Lentizellenwucherungen jedoch zahlreiche Infektionen an den Lentizellen auf.

Wachsende Knollen werden dagegen sehr leicht befallen. Augen, Stolonen, vor allem Lentizellen und wahrscheinlich auch die lockere, noch nicht gefestigte Korkschale dienen bei ihnen als Eintrittspforten.

VI. Die Bedeutung der Bodenverhältnisse

a) Für die Knolleninfektion

Je nach Art und Zustand des Bodens ist ein unterschiedlicher Einfluß auf den *Phytophthora*-Knollenbefall folgendermaßen denkbar:

1. Der Boden könnte die stoffliche Zusammensetzung oder die physiologischen Eigenschaften der Knolle im Sinne einer unterschiedlichen Widerstandskraft beeinflussen.
2. Luft- und Wasserversorgung des Bodens könnten durch Beeinflussung der Schalen- und Lentizellenbeschaffenheit die Anfälligkeit der Knolle verändern (Löhnis 1923).
3. Je nach Porengröße und Hohlraumvolumen des Bodens könnte der Durchtritt der Sporen mehr oder weniger stark behindert sein (Zitzewitz 1951).
4. Der Boden kann pilzschädliche Stoffe enthalten.

Für eine generelle Beantwortung der ersten Frage war die Auswahl der zur Verfügung stehenden Böden zu gering. In dem beschriebenen Gefäßversuch scheint es für die postinfektionelle Krankheitsentwicklung gleichgültig gewesen zu sein, ob die Knollen in Sand- oder Lehmboden gewachsen waren. Unter gleichen Bedingungen infizierte abgeerntete, einige Tage abgelagerte ganze und halbierte Knollen beider Böden ließen keine Befallsunterschiede erkennen.

Zu dem zweiten Punkt können auf Grund der eigenen Untersuchungen über die Entwicklungsbedingungen der Lentizellenwucherungen und über die Anfälligkeit mit ihnen behafteter Kartoffelknollen die Überlegungen von Löhnis (1923) bestätigt werden: Schwere, durchnäßte und schlecht durchlüftete Böden führen durch Förderung von Lentizellenwucherungen zu erhöhter Anfälligkeit der Knollen.

Zum dritten Punkt schreibt Zitzewitz (1951): „Sandiger Boden kann wie ein Sieb wirken und bei schwerem Boden entscheiden die Platzrillen." Inwieweit bei meinem Gefäßversuch Porengröße und Hohlraumvolumen für den hohen Knollenbefall im Lehmboden von Bedeutung waren, wird an Hand eines weiter unten beschriebenen Versuches erörtert.

Der vierte Punkt, die Bedeutung pilzschädlicher Stoffe im Boden für die Infektion, ist für die künstliche Zufuhr von Kupfer im letzten Abschnitt behandelt.

Um die Filterwirkung der Böden des Gefäßversuches auf die Sporen von *Phytophthora infestans* zu prüfen, wurde folgende Versuchsanordnung gewählt:

Glaszylinder von 6,3 cm Durchmesser wurden einseitig mit einer Gazeschicht verschlossen und wie folgt mit einer Schicht lufttrockenen gesiebten (1 mm Maschenweite) oder gekrümelten Bodens gefüllt:

1. gesiebter Sand- und Lehmboden, je 2 Gefäße, $^1/_2$ cm hoch;
2. „ „ „ „ , je 1 Gefäß, 1 cm hoch;
3. „ „ „ „ , je 1 Gefäß, 5 cm hoch;
4. locker gekrümelter Sand- und Lehmboden, je 1 Gefäß, 5 cm hoch.

Aufgedeckte Petrischalenhälften wurden mit einem Tondreieck belegt, auf das die Zylinder gestellt wurden.

Mit Ausnahme je eines Gefäßes der $^1/_2$ cm hohen Sand- und Lehmbodenfüllung wurden sämtliche Gefäße einen Tag vor Versuchsbeginn mit Wasser im Überschuß versehen, so daß nach dessen Ablauf der Boden bei Beginn des Versuches gut durchfeuchtet war. Am Versuchstag wurden jedem Gefäß mit der Pipette 20 ccm Zoosporen-Aufschwemmung einer Dichte von 15 000 Sporen/ml zugefügt. Nach 2 Stunden war die Flüssigkeit durch den Boden hindurchgesickert und hatte sich im Petrischalendeckel gesammelt. Diese nahezu klaren „Filtrate" wurden nunmehr gut durchgerührt und mit der Thoma-Zählkammer auf die Dichte der Zoosporen untersucht. In Tabelle 6 ist die Zoosporendichte einer jeden Probe in Prozent zu derjenigen der Ausgangssuspension angegeben.

Tabelle 6

Absorption von *Phytophthora*-Zoosporen in Sand- und Lehmboden verschiedener Schichthöhe und Zustandsform

Beschaffenheit und Schichthöhe des Bodens	Zoosporen im Filtrat in % zur Ausgangssuspension bei Passage durch	
	Sandboden	Lehmboden
gesiebter Feinboden ½ cm hoch, angefeuchtet	49,8	51,5
trocken	26,7	0,15
gesiebter Feinboden 1 cm hoch, angefeuchtet	1,33	0,52
gesiebter Feinboden 5 cm hoch, angefeuchtet	0	0
locker gekrümelter Boden 5 cm hoch, angefeuchtet	0	5,5

Aus diesen Zahlen kann folgendes geschlossen werden: Die Durchlässigkeit des Bodens für Zoosporen ist je nach Bodenart, Bodenzustand und

Schichthöhe unterschiedlich. Der feinkörnige Lehmboden in feuchtem, gequollenem Zustand hält die Zoosporen wesentlich stärker zurück als der entsprechende Sandboden. Mit zunehmender Schichthöhe verringert sich der Unterschied schnell, um bei 5 cm ganz zu verschwinden. In der natürlichen Krümellage erweist sich jedoch der Lehmboden als durchlässiger.

b) Für die Verfügbarkeit des Kupfers

Nicht alles Kupfer ist biologisch wirksam. Reaktionsfähig ist nur das lösliche Kupfer und von diesem nach GOLDSWORTHY u. M. (1938) nur der ionisierte Anteil entscheidend für die „availability" und die Giftigkeit. Aus zahlreichen Untersuchungen über die Heidemoorkrankheit ist bekannt, daß die Verfügbarkeit des Kupfers je nach Bodenart sehr verschieden sein kann.

Wie früher beschrieben, erhielten die behandelten Töpfe 1954 im Gefäßversuch 3 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ = 0,75 g reines Cu. Bei einem Erdgewicht von 5 kg errechnet sich daraus eine Cu-Konzentration von 0,015 %. Wenn alles Kupfer löslich wäre, müßte, da das Verhältnis Wasser : Boden immer kleiner war als 1 und die verwendeten Böden von Natur aus schon einen gewissen Kupfergehalt aufwiesen, die Kupferkonzentration in der Bodenlösung eine höhere sein. In der folgenden Gegenüberstellung sei jedoch der theoretische Wert für den Cu - Gehalt der Bodenlösung ebenfalls mit 0,015 % angesetzt.

Nach etwa zweimonatiger Versuchsdauer erhielten die Töpfe während eines mehrtägigen Regens soviel Wasser, daß dieses in den seitlichen Durchlüftungskanälen hochstieg, ohne allerdings überzulaufen. Von 10 Töpfen je Versuchsgruppe wurde mit der Pipette Flüssigkeit aus den seitlichen Kanälen abgesogen; die jeweiligen Sammelproben wurden auf Kupfer analysiert. Dabei wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Werte ermittelt.

Tabelle 7

Kupfergehalt im Sickerwasser

Bodenart	Behandlung	γ Cu/l Sickerwasser
Sand	O	100
	Cu	200
Lehm	O	80
	Cu	80

Es zeigt sich, daß die Kupfergabe im Lehmboden den Cu - Gehalt in der Bodenlösung nicht veränderte, im Sandboden führte sie zu einer absoluten Erhöhung um 100 γ/l oder 0,00001 % Cu. Das bedeutet, daß weniger als $^1/_{1000}$ des zugeführten Kupfers (0,015 %) noch in löslicher Form vorlag. Der Kupfergehalt sämtlicher Proben lag unterhalb des pilzwirksamen Schwellenwertes, was auch durch Sporenkeimteste mit den Versuchslösungen bestätigt werden konnte.

Um eine Vorstellung von den Löslichkeitsverhältnissen des Bodenkupfers in den einzelnen Gruppen zu gewinnen, wurden nach dem Abernten des Ver-

suches nach verschiedenen Methoden Kupferanalysen der Böden durchgeführt. Dabei wurde auf folgende Weise vorgegangen:

Von jeder Versuchsgruppe wurde nach gründlicher Durchmischung der Erde aus dreimal drei Töpfen jeweils 1 kg feuchter Boden entnommen. Von der Hälfte jeder Probe wurde auf Grund des Gewichtsverlustes beim Trocknen an der Luft der prozentuale Wassergehalt bestimmt. Er lag bei allen Gruppen zwischen 15 und 20 %. Der feuchte Boden, sowie der lufttrockene nach Zermörserung und Absieben der Teilchen > 1 mm ϕ, wurden als Ausgangsmaterial für folgende Analysen verwendet:

1. Totalkupfer: 2 g lufttrockener, gemörserter und gesiebter Boden wurden mit 10 ccm konzentrierter HNO_3, 3 ccm konzentrierter H_2SO_4 und 5 ccm 65%iger Perchlorsäure naß verascht. Beim Auftreten von H_2SO_4-Dämpfen wurde vom Feuer abgesetzt, nach Abkühlung 10 ccm Zitratlösung und Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion zugefügt und mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Mit einem abgemessenen Anteil dieser Flüssigkeitsmenge wurde die Kupferanalyse durchgeführt.

2. HCl-lösliches Kupfer: 50 g lufttrockener, gemörserter und gesiebter Boden wurden mit 250 ccm 10%iger HCl sechs Stunden im Schüttelapparat geschüttelt. Ein abgemessenes Volumen wurde nach Absetzen des Bodens, wie unter 1 beschrieben, alkalisiert und analysiert.

3. Acetat-Auszug: Zu 50 g lufttrockenem, gemörsertem und gesiebtem Boden wurden 50 ccm Morgans-Bodenextraktionslösung, enthaltend 100 g Na-Acetat und 30 ccm Eisessig im Liter, gegeben und 10 min geschüttelt. Nach dem Absetzen wurde ein abgemessenes Volumen, wie unter 2 bzw. 1 beschrieben, weiterverarbeitet.

4. H_2O-Auszug: 50 g lufttrockener, gemörserter und gesiebter Boden wurden mit 250 ccm aqua dest. sechs Stunden geschüttelt. Nach Absetzen eines Großteiles des Bodens wurde die noch trübe Lösung zentrifugiert. Mit der klaren Lösung wurde weitergearbeitet, wie unter 1 und 2 beschrieben.

5. Cu in der Bodenlösung: Ein Teil des feuchten Bodens wurde bei 200 at Druck gepreßt. In der ablaufenden Bodenlösung wurde das Kupfer bestimmt, wie unter 1 beschrieben.

Die nach den verschiedenen Methoden gewonnenen Analysenergebnisse sind, auf γ Cu/g lufttrockenen Boden bezogen, als Mittelwerte von 3 Bestimmungen in Tabelle 8 zusammengestellt. Das Kupfer in der Bodenlösung wurde einmal in γ Cu/l Bodenlösung ausgedrückt (Spalte 6); zum anderen konnte aus dem relativen Feuchtigkeitsgehalt des Bodens und der Kupferkonzentration in der Bodenlösung diejenige Kupfermenge errechnet werden, die in der auf 1 g Boden entfallenden Flüssigkeitsmenge enthalten ist (Spalte 5).

Tabelle 8 zeigt folgendes:

Zu Spalten 1 und 2: Die Werte von Naßveraschung und HCL-Auszug entsprechen sich ungefähr. Der Lehmboden ist von Natur aus kupferreicher als der Sandboden. Die Kupferbehandlung hat bei beiden Böden zu einer Vervielfachung des Cu-Gehaltes geführt. Die absolute Zunahme von etwa 150 γ/g Boden spiegelt die Zugabe von 3 g Kupfersulfat je Topf (5 kg Boden) recht gut wider: 150 γ Cu/g = 150 mg Cu/kg = 750 mg Cu/5 kg = 3 g $CuSO_4 \cdot H_2O$ auf 5 kg.

Zu Spalte 3: Der acetatlösliche, nach King (1947) für die Pflanze zugängliche Anteil des Kupfers liegt um 1 bis 2 Zehnerpotenzen niedriger als das Totalkupfer. Der relative Unterschied zwischen Kontrolle und „gekupfert" hat sich, vor allem beim Sandboden, stark vergrößert.

Tabelle 8

Analyse der Gefäßversuchsböden auf Kupfer in den verschiedenen Löslichkeitsstufen

	γ Cu/g Boden					γ Cu/l Bodenlösung
	Total (Naßveraschung)	HCl-auszug	Acetat-auszug	H_2O-auszug	in der Bodenlösung	
	1	2	3	4	5	6
Sand, Kontrolle	13,5	9,31	0,261	*)	0,00867	53,4
gekupfert	163,0	154,67	25,1	*)	0,0207	135,2
Lehm, Kontrolle	32,4	26,18	0,3207	*)	0,0200	100,3
gekupfert	195,0	188,5	15,58	*)	0,0301	156,1

*) Siehe Text.

Zu Spalte 4: Bei der Analyse der H_2O-Auszüge war der Extinktionswert stets geringer als der Blindwert bei Analyse des verwendeten Wassers. Das bedeutet, daß durch Wasser nicht nur kein Kupfer aus dem Boden herausgelöst wurde, sondern daß sogar der geringe Kupferanteil des Auszugwassers teilweise vom Boden noch absorbiert wurde.

Zu den Spalten 5 und 6: Das in Lösung befindliche Cu, bezogen auf g Boden, beträgt in allen Fällen weniger als 1 Promille des Totalkupfers. Die Kupferung hat einen Anstieg von 60 bis 80 γ Cu/l Bodenlösung bewirkt. Auch wenn dieses Kupfer gänzlich in pilzwirksamer Form vorläge, wäre bei den ermittelten Cu-Konzentrationen noch kein fungizider Effekt gegeben.

Nun ist die Bodenlösung aber mehr oder weniger stark angereichert mit Salzen und organischen Komplexbildnern, Stoffgruppen also, von denen bekannt ist, daß manche ihrer Vertreter auf Kupfer inaktivierend wirken. Ein Sporenkeimtest sollte daher zeigen, in welchem Ausmaß Cu von der Bodenlösung inaktiviert werden kann.

Die Versuchslösungen wurden hergestellt, indem 1 ccm Sporenaufschwemmung (Dichte etwa 30 000 Sporen je ccm) zu 1 ccm Cu-Lösung bzw. zu 2 ccm Bodenpreßsaft + 1 ccm Cu-Lösung zugefügt wurde. In Anbetracht der dabei entstehenden Verdünnung wurde die Kupferlösung im ersten Fall in doppelter, im zweiten Fall in vierfacher Versuchskonzentration angesetzt. Für jede Konzentration wurde 1 Objektträger (5 Tropfen) ausgezählt. Die Keimzahlen wurden nach der Probitanalyse von FINNEY (1952) verrechnet. Das Ergebnis lautet:

Reine Cu-Sulfatlösung:

$$Y = 5{,}056\,x - 10{,}341$$
$$b = 5{,}056 \pm 0{,}480\ (0{,}1\ \%)$$
$$\chi^2 = 72{,}67 \text{ (Tabellenwert 37,9), Heterogenitätsfaktor 1,913}$$
$$LD_{50} = 1384 \pm 19{,}9\ \gamma\ Cu/l$$

Gekupferter Bodenpreßsaft: $Y = 5{,}133\,x - 15{,}777$
$b = 5{,}133 \pm 0{,}480$ (0,1 %)
$\chi^2 = 22{,}06$ (Tabellenwert 37,9)
$LD_{50} = 11\,160 \pm 137{,}8\ \gamma$ Cu/l

Die beiden Kurven sind annähernd geradlinig und parallel. Die mittlere logarithmische Differenz zwischen zwei gleich wirksamen Konzentrationen ist 0,9066. Die relative Wirksamkeit des Kupfers im Preßsaft beträgt etwa 1/8.

Die Ergebnisse über das Verhalten des Kupfers im Boden zeigen, daß das Kupfer im Boden nur zu einem sehr geringen Teil löslich ist und das darüber hinaus das in Lösung befindliche Cu größtenteils in fungizid nicht wirksamer Form gebunden ist.

Die Unwirksamkeit der Kupfergaben in den geschilderten Versuchen findet damit ihre hinlängliche Erklärung.

VII. Diskussion der Ergebnisse

Voraussetzung für die Entwicklung von Bekämpfungsverfahren ist das genaue Wissen um die einzelnen Phasen des Krankheitsgeschehens. Wie eingangs dargelegt, bestanden über die durch *Phytophthora infestans* verursachte Knollenfäule der Kartoffeln noch manche Unklarheiten. Die Notwendigkeit grundsätzlicher Untersuchungen über die für sie bestimmenden Bedingungen wurde verstärkt durch die Befallsergebnisse der im ersten Teil beschriebenen Gefäß- und Freilandversuche. Während einige amerikanische Autoren (Jones u. M., 1912; Skaptason u. M., 1940; Peterson, 1947) durch Kupferspritzungen des Bodens den Knollenbefall vermindern und damit einen Beleg für den „extraplantären" Infektionsweg bei der Knollenfäule beibringen konnten, blieben die wesentlich höheren Kupferaufwendungen in meinen Versuchen nahezu wirkungslos. Damit war erneut die meist verneinte Frage aufgeworfen, ob der Pilz von den Blättern durch Stengel und Stolonen bis in die Knollen wachsen kann. Daraufhin wurden die Möglichkeiten der Knolleninfektion systematisch untersucht.

Da allen bisherigen Untersuchungen zu dieser Frage große Ungenauigkeiten und Fehlerquellen anhafteten, wurde eine naturgemäße Methode entwickelt, die es erlaubt, im Wachstum befindliche Knollen ohne vorherige Berührung im Boden zu infizieren. Dabei konnte die Ansicht früherer Autoren, daß normalerweise keine Infektion durch Myzelwachstum vom Blatt über Stengel und Stolo in die Knolle stattfindet, bestätigt werden.

Es konnte weiter gezeigt werden, daß die Anfälligkeit der Knolle je nach Alter und Zustand sehr unterschiedlich sein kann. Hierin finden m. E. auch die bisherigen Widersprüche großenteils ihre Erklärung. Junge Knollen und Knollen mit Lentizellenwucherungen erwiesen sich als besonders anfällig. Vor allem erstere waren schon wenige Tage nach der Infektion auf ihrer ganzen Oberfläche mit Infektionsherden bedeckt; abgereifte oder nahezu reife Knollen wurden dagegen nur vereinzelt an den Augen befallen. Das Alter der Knollen wirkt sich demnach in quantitativer — wesentlich mehr Befall an jungen Knollen — wie auch in qualitativer Hinsicht — Be-

fall an älteren, unbeschädigten Knollen fast ausschließlich an den Augen — auf den Befall aus. Auch ältere Knollen können aber leicht infiziert werden, wenn Lentizellenwucherungen vorliegen. Die Tatsache, daß letztere besonders leicht an wachsenden Knollen hervorgerufen werden können und, wie der feuchte Sommer 1956 zeigte, bei durchnäßtem Boden häufig spontan auftreten, erklärt zusätzlich die große Anfälligkeit junger Knollen.

Schließlich können auch die Stolonen für den Knollenbefall eine wichtige Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, daß sie sehr anfällig sind und die Pilzhyphen in ihrem Gewebe schnell in die jungen Knollen vorzudringen vermögen. Auch wenn die Knollen bereits weitgehend mit einer stärkeren, zusammenhängenden Korkschale ausgestattet waren, erwiesen sich die Stolonen noch voll anfällig. Im Lauf der letzten Jahre konnte ich häufig beobachten, daß bei erntereifen, teilbefallenen Knollen in etwa 30 bis 50 % der Fälle nur die Nabelpartie erkrankt war. Es liegt nahe, diese Erkrankungsfälle auf Stoloinfektionen zurückzuführen. Bei etwa der Hälfte aller auswertbaren Fälle waren die erkrankten Flächen um die Augen gruppiert, die nach den mitgeteilten Versuchsergebnissen als Eingangspforte angenommen werden dürfen.

Danach scheint mir kein Grund, die Hauptursache der spontanen Knolleninfektionen in Verletzungen zu sehen, wie dies u. a. auch Vohwinkel (1926) annimmt. Das Entstehen von Platzwunden, also echter Verletzungen, die im extrem regenreichen Sommer 1956 häufig als Ausgangspunkt der *Phytophthora*fäulnis an nahezu erntereifen Knollen anzutreffen waren, darf wohl als Ausnahme betrachtet werden. Diese Beobachtung bestätigt andererseits indirekt die Feststellung, daß normalerweise nur wenige Stellen an der nahezu ausgewachsenen Knolle für das Eindringen der *Phytophthora* in Frage kommen. In gleichem Sinne ist die Feststellung van der Zagg's (1945) zu deuten, daß in Holland bei Verwendung von Chemikalien zum Totspritzen des Kartoffellaubes nur halb so viel Knollenfäulnis auftrat wie beim zeitigen Ausreißen des Laubes von Hand, bei dem die Knollen durch Abreißen der Stolonen verletzt werden. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Feststellung von Schultz (1952), daß in einem Feldbestand 30 % der Pulverschorf-befallenen Knollen auch *phytophthora*krank waren, während die schorffreien Knollen auch keine *Phytophthora* hatten.

Eine andere Frage ist, wie weit B e s c h ä d i g u n g e n b e i d e r E r n t e für die Knollenfäulnis von Bedeutung sind. Bonde und Schultz (1945) sehen hierin die Hauptquelle der Infektion. Es besteht kein Zweifel, daß abgeerntete Knollen durch Verletzungen leicht befallen werden können; Voraussetzung ist jedoch das Vorhandensein von Infektionsmaterial, d. h. von sporentragendem Laub. In vielen Fällen, gerade in *Phytophthora*jahren, ist das Laub bei der Ernte schon weitgehend abgestorben. In anderen Fällen wird es gemäht oder im Pflanzgutbau zur Unterbindung der Virusabwanderung totgespritzt oder ausgerissen. Wenn sporentragendes Laub noch zur Erntezeit vorliegt, sind die dann stattfindenden Infektionen besonders nachteilig, da sie im Lager um sich greifen können, während in der Vegetationszeit erkrankte Knollen bei der Ernte aussortiert werden können.

Die Ursache für den oft nicht unerheblichen Befall bei der Ernte ist jedoch in Spontaninfektionen der sehr anfälligen jungen Knollen oder der weiter entwickelten Knollen an den aufgezeigten Stellen zu sehen.

Die Rolle, die d e r B o d e n bei der Entstehung der Knollenfäule spielt, ist nach den vorliegenden Untersuchungen zunächst die eines Filters, das die Sporen passieren müssen, um an die Knollen zu gelangen. Je nach Porenweite gelingt ihnen die Passage mehr oder weniger gut. Grobkörniger Sandboden müßte demnach für die Infektion günstiger sein als feinkörniger Lehmboden. Nun stellt der Boden jedoch nicht eine homogene Verteilung von Einzelkörnern, Luft und Flüssigkeit dar, sondern die kleinsten Teile sind zu größeren, den Krümeln, vereinigt, zwischen denen ein unterschiedliches Hohlraumsystem verbleibt. Schließlich können durch mancherlei Vorgänge (Austrocknen, Niederschläge, Dickenwachstum und Zerfall von unterirdischen Pflanzenteilen, Erdbewegungen durch Bodentiere) Gänge und Spalten entstehen. Das Filter hat Löcher und Risse. Dadurch kann die Bedeutung der Porenweite des Filters völlig zurücktreten. Das zeigt sich deutlich in dem auf Seite 255 f. beschriebenen Versuch. Bei der „Einzelkornlage", bedingt durch vorheriges Trocknen, Zermörsern und Sieben des Bodens, ist der Sandboden, in der natürlichen Lage hingegen der besser gekrümelte Lehmboden durchlässiger.

Wichtiger noch als die Korngröße scheint nach Tabelle 16 die Quellfähigkeit des Boden zu sein. Wenn auf trockenen, gesiebten Boden eine Sporensuspension gebracht wird, passiert sie den Lehm- und Sandboden etwa gleich gut; rund 50 % der Sporen gelangen durch eine $^1/_2$ cm dicke Erdschicht. Ist der Boden aber 24 Stunden vorher angefeuchtet worden, so ist der Prozentsatz im Sandboden 27 %, im Lehmboden weniger als 1 %. Der kolloidreiche Lehmboden hält die Sporen also stärker zurück.

Wenn dennoch in den eigenen Gefäßversuchen und nach Freilandbeobachtungen von Löhnis (1923) im Lehmboden mehr Befall auftritt als im Sandboden, so wird man mit Stebel (1892), Klapp (1950) und Zitzewitz (1951) die besonders im Lehmboden auftretenden Platzrillen dafür verantwortlich machen müssen, durch die sporenbeladenes Regenwasser unmittelbar an die Knollen gespült wird. Dazu kommt in feuchten Jahren die in den eigenen Versuchen nachgewiesene Möglichkeit der Infektion durch Lentizellenwucherungen, die, wie gezeigt, besonders im Lehmboden gegeben ist.

Schließlich ist noch die Frage der Bekämpfung der Knollenfäule durch Bodenkupferung zu erörtern.

Nach amerikanischen Untersuchungen soll der hohe Kupfergehalt alter Kartoffelkulturböden, hervorgerufen durch die ständigen Kupferspritzungen, die Knollenfäule stark einschränken. Jones u. M. (1912) konnten einen merklichen Befallsrückgang beobachten, wenn sie den Boden vorher mit Kupferkalk spritzten. Kupfer scheint hiernach im Boden wirksam gewesen zu sein. In der augenblicklich herrschenden Diskussion um die Verwendung von Kupfermitteln oder organischen Fungiziden zur *Phytophthora*bekämpfung wird als Argument für Kupfer oft angeführt, daß nach Kupferspritzung weniger Knollenfäule auftrete als nach Behandlung der Stauden mit orga-

nischen Mitteln. Als Begründung wird angeführt, daß der ablaufende oder auf den Boden gelangende Kupferbrüheanteil die Bodenoberfläche mit einem fungizid wirksamen Belag überziehe. Die organischen Mittel seien dagegen im oder auf dem Boden sehr bald der Zersetzung unterworfen.

Bei einer normalen *Phytophthora*spritzung werden im Durchschnitt 4 kg 50%iges Kupfersalz = 2 kg metallisches Kupfer je Hektar ausgebracht. Wenn man annimmt, daß etwa die Hälfte davon auf den Boden gelangt, würden dem Boden bei dreimaliger Spritzung im Jahr 3 kg metallisches Kupfer je Hektar zugeführt. In den eigenen Gefäß- und Freilandversuchen gelangten Kupfersulfatmengen zur Anwendung, die bis zu 200 kg/ha metallischem Kupfer entsprachen, also etwa dem 70fachen des „normalen" Aufwandes. Selbst diese hohen, an die Grenze der Pflanzenverträglichkeit heranreichenden Kupfermengen hatten in meinen Versuchen praktisch keinen Einfluß auf den Knollenbefall. Wenn man darüber hinaus noch berücksichtigt, daß, nach meinen Versuchen, nur ein verschwindend geringer Teil des dem Boden zugeführten Kupfers fungizid wirksam, alles übrige aber festgelegt oder inaktiviert ist, kann man von dem durch die jährlichen Spritzungen dem Boden zugeführten Kupfer kaum einen fungiziden Effekt erwarten. Auch jede andere Art der Bodenkupferung scheint sich auf Grund meiner Versuchsergebnisse nicht für eine praktische Bekämpfung der Knollenfäule verwerten zu lassen.

Was den höheren Knollenbefall nach Blattbehandlungen mit den organischen Mitteln im Verhältnis zu „Kupfer gespritzt" anbelangt, so könnte man trotz eventuell gleicher Einschränkung des Laubbefalls an eine zeitweilig stärkere Sporulation bei „organisch gespritztem" Laub denken, wodurch die Infektionschance für die Knollen unter Umständen vervielfacht werden könnte. Solange jedoch keine exakten Versuche unter vergleichbaren Bedingungen vorliegen, kann zu dieser Frage keine eindeutige Stellung genommen werden.

Zusammenfassung

Mangelndes Wissen um die Infektionsverhältnisse bei der durch *Phytophthora infestans* hervorgerufenen Knollenfäule der Kartoffel sowie das Bestreben, ihre Bekämpfungsmöglichkeiten zu verbessern, führten dazu, den Komplex der *Phytophthora*-Knollenfäule unter verschiedenen Gesichtspunkten zu bearbeiten. Untersuchungen über den Infektionsmodus der Krankheit (A), über ihre Abhängigkeit vom Zustand des Bodens (B) und über ihre Beeinflußbarkeit durch Kupferdüngung (C) brachten folgende Ergebnisse:

A. 1. Die Knollen werden von Sporen infiziert, die am Blatt gebildet und durch den Regen in den Boden und an die Knollen gespült werden. Ein Herabwachsen der Hyphen von befallenen Blättern durch Stengel und Stolo bis zur Knolle konnte nicht beobachtet werden.

2. Der Reifezustand der Knolle entscheidet über Art und Höhe der Anfälligkeit:

a) Junge, unausgereifte Knollen werden sehr leicht an Augen, Lentizellen, wahrscheinlich auch durch die noch nicht gefestigte Korkschale befallen.

b) Reife Knollen sind nur an den Augen und am Nabel, nach länger dauerndem Infektionsmilieu vereinzelt auch an Lentizellen zu infizieren.

3. Die Stolonen sind sehr anfällig und gestatten ein schnelles Vordringen der Hyphen bis in die Knolle.

4. Lentizellenwucherungen, die, besonders leicht an jungen Knollen, in feuchten, schlecht durchlüfteten Böden spontan auftreten und durch mehrwöchiges Einlagern abgeernteter Knollen in feuchtem, sterilem Torfmull künstlich induziert werden können, sind bevorzugte Eintrittspforten des Pilzes.

B. 1. Teilchengröße und Hohlraumgliederung des Bodens haben große Bedeutung für die Schwere des Befalls. In fein gesiebter Form ist der sandige Boden, bei natürlicher Lagerung der lehmige, besser krümelnde Boden für die *Phytophthora*-Sporen durchlässiger.

2. Lehmboden begünstigt in feuchten Jahren die Bildung von Lentizellenwucherungen und damit auch das Auftreten der Knollenfäule.

C. 1. Kupferdüngung bis zu 500 bzw. 800 kg/ha Cu-Sulfat erbrachte weder in Freiland- noch in Gefäßversuchen eine ins Gewicht fallende Abnahme des Knollenbefalls.

2. Das Kupfer unterliegt im Boden starken Bindungskräften. Nur $^1/_{10}$ bis $^1/_{100}$ des zugeführten Kupfers war als „pflanzenverfügbares" und nur etwa $^1/_{1000}$ in der Bodenlösung nachzuweisen.

3. Das wenige in der Bodenlösung befindliche Kupfer ist darüber hinaus größtenteils inaktiviert. In Sporenkeimtesten mit Bodenlösung war nur $^1/_8$ des zugeführten Kupfers fungizid wirksam.

Danach erscheint es praktisch nicht möglich, den Boden ausreichend mit fungizid wirksamem Kupfer zu versorgen. Das beste Verfahren, die Knollenfäule einzuschränken, ist daher nach wie vor die Krautfäulebekämpfung.

Literaturverzeichnis

DE BARY, A., 1861: Die gegenwärtig herrschende Kartoffelkrankheit, ihre Ursache und ihre Verhütung. Leipzig.

BLUMER, S., und J. KUNDERT, 1951: Methoden der biologischen Laborprüfung von Kupferpräparaten. Phytopath. Z. **17**, 161—199.

BONDE, R., and E. S. SCHULTZ, 1945: The control of potato tuber rot. Amer. Potato J. **22**, 163—167.

BOYD, A. E. W., and J. M. HENDERSON, 1953: Susceptibility of immature potato tubers to blight. Plant Pathol. **2**, 113—116.

ESMARCH, F., 1920: Beiträge zur Anatomie der gesunden und kranken Kartoffelpflanze. Landw. Jb. **54**, 160—266.

FINNEY, D. J., 1952: Probit Analysis. Cambridge.

GOLDSWORTHY, M. C., and E. L. GREEN, 1938: Effect of copper on germination and growth of conidia. J. Agr. Res. **56**, 489—505.

HECKE, L., 1898: Untersuchungen über *Phytophthora infestans* als Ursache der Kartoffelkrankheit. J. Landw. **46**, 71—74, 97—142.

JONES, L. R., N. J. GIDDINGS, and B. F. LUTMAN, 1913: Investigations of the potato fungus *Phytophthora infestans*. Ref. in Cbl. Bakt. **38**, 171—172.

Killian, 1920: Zur Anatomie des Kartoffelschorfes. Landw. Jb. **54**, 267—276.

King, A. V., 1947: A method for the determination of soluble copper in soils. J. Amer. Soc. Agronom. **39**, 610—615.

Klapp, E., 1950: Kartoffelbau. Stuttgart.

Klaus, H., 1941: Untersuchungen über *Alternaria solani*, insbesondere über seine Pathogenität an Kartoffelknollen in Abhängigkeit von den Außenfaktoren. Phytopath. Z. **13**, 126—195.

Kopetz, L. M., und O. Steineck, 1949: Vergleichende Versuche zur voreiligen Pflanzgutbestimmung von Kartoffeln. Die Bodenkultur **4**, 487—505.

Linder, A., 1951: Statistische Methoden. Basel.

Löhnis, M. P., 1922: Onderzoek over *Phytophthora infestans* op de Aardappelplant. Wageningen.

— —, 1923: Report of the International Conference of Phytopathology and Economic Entomology. Holland.

Longrée, K., 1932: Untersuchungen über die Ursachen des verschiedenen Verhaltens der Kartoffelsorten gegen Schorf. Arb. Biol. Reichsanst. **19**, 285—336.

Lutman, B. F., 1913: The pathological anatomy of potato scab. Phytopathology **3**, 255 bis 264.

McCallan, S. E. A., R. H. Wellmann, and F. Wilcoxon, 1941: An analysis of factors causing variation in spore germination tests of fungicides. III. Contr. Boyce Thomps Inst. **12**, 49—78.

McKay, R., 1955: Potato Diseases. Irish Pot. Marketg. Comp. Dubl.

Noll, A., 1940: Untersuchungen über die Biologie und Bekämpfung des Kartoffelkrebses (*Actinomyces*). Landw. Jb. **89**, 41—113.

Nydahl, F., 1939: Die Bestimmung des Kupfers im Rauhfutter nach der Diäthyldithiocarbamat-Methode. Z. analyt. Chem. **116**, 315—328.

Peterson, L. C., 1947: The overwintering of *Phytophthora infestans* under Long Island conditions. Amer. Potato J. **24**, 188—196.

Rademacher, B., 1932: Praktische Möglichkeiten zur Verhütung und Bekämpfung der Urbarmachungskrankheit. Fortschr. Landw. **7**, 457—461.

— —, 1936: Die Heidemoorkrankheit unter besonderer Berücksichtigung der Kupferfrage. Arb. Biol. Reichsanst. **21**, 531—603.

Rauterberg, E., und F. Kremkus, 1951: Bestimmung von Gesamthumus und alkalilöslichen Humusstoffen im Boden. Z. Pflanzenernährg. Düngg. Bodenkde. **54**, 240—249.

Riehm, E., 1912: Neuere Forschungen über *Phytophthora infestans*, den Erreger der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel. Landw. Presse **39**, 1045.

— —, 1928, in: Sorauer Handb. f. Pflanzenkrankheiten II, 1.

Schilling, E., 1915: Über hypertrophische und hyperplastische Gewebewucherungen an Sproßachsen, verursacht durch Paraffin. Jb. wiss. Bot. **55**, 177; 199 ff.

Schultz, E. S., 1952: Powdery scab, a precursor for the late blight infection of blight immune potato tubers. Phytopathology **42**, 343.

Skaptason, S. B., F. M. Blodgett, and L. C. Peterson, 1940: The Copper content of Long Island soils in relation to tuber rot of potatoes caused by *Phytophthora infestans*. Amer. potato J. **17**, 88—92.

Snedecor, G. W., 1946: Statistical methods. Jowa State Coll. Press.

Stebel, E. V., 1892: Versuch, betreffend die Bekämpfung der Kartoffelkrankheit durch Verwendung der Kupfervitriolpräparate. Stuttgart.

van der Zaag, D. E., 1954: Looftrekken of doodspuiten van Aardappelen? T. Pl. Ziekt. **60**, 256—258.

Vohwinkel, O., 1926: Die Anfälligkeit deutscher Kartoffelsorten gegenüber *Phytophthora infestans* (Mont) de By., unter besonderer Berücksichtigung der Untersuchungsmethoden. Arb. Biol. Reichsanst. **14**, 588—641.

de Vries, 1878: Keimungsgeschichte der Kartoffelknollen. Landw. Jb. **VII**, 217—249.

Zeck, W., 1956: Untersuchungen über den Einfluß des Kupfers auf die Kartoffelpflanze und über seine fungizide Wirksamkeit im Pflanzeninnern. Phytopath. Z. **27**, 353—404.

Zitzewitz, V. A., 1951: Krautfäulebetrachtung 1950. Der Kartoffelbau **2**, 96—98.

Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich

Über den Einfluß des Lycomarasmins und seiner Schwermetallkomplexe auf die Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten[1])

Von

Ernst Gäumann und Elisabeth Bachmann

Mit 5 Abbildungen

Das *Fusarium lycopersici* bildet schon in den ersten Tagen der Pathogenese mindestens drei Toxine, nämlich Fusarinsäure, Äthylen und Lycomarasmin. Das Lycomarasmin, das uns hier interessiert, läßt sich am 7. Tage nach der Beimpfung der Kulturen in einer Menge von etwa 10 mg/l in den Kulturfiltraten nachweisen; dies entspricht einer Konzentration von rund $5 \cdot 10^{-5}$ molar. Doch ist nicht ausgeschlossen, daß es im Innern des Wirtes in noch größeren Mengen gebildet wird. Markiert man nämlich einen schwach virulenten und einen hochvirulenten Stamm des *Fusarium lycopersici* mit ^{14}C, infiziert die beiden Pilzstämme in Tomatenpflanzen und bestimmt nach 15 Tagen die von ihnen in vivo gebildeten radioaktiven Stoffwechselprodukte, so liegt der einzige sinnvolle Unterschied im Sektor der Aminosäuren und der Proteine, also bei jener Stoffgruppe, zu der das Lycomarasmin gehört; dieser Sektor enthält beim schwach virulenten Stamm 21,5 % der gesamten Aktivität, beim hochvirulenten Stamm dagegen 29,5 %, also fast die Hälfte mehr (Sanwal, 1956).

Unmittelbare quantitative Bestimmungen über das Ausmaß der vom Lycomarasmin in den Tomatenpflanzen ausgelösten Schädigungen wurden bis jetzt erst im Sektor der Permeabilitätsstörungen durchgeführt. Dabei ergab es sich einerseits, daß das Lycomarasmin die Semipermeabilität der Plasmagrenzschichten in den Tomatensprossen entscheidend schädigt, so daß pathologische Mengen von anorganischen Ionen und von Aminosäuren schon vor dem Erscheinen der Welkesymptome aus dem Zellinnern an die Blattoberfläche gelangen (Linskens, 1955). Und anderseits schädigt das Lycomarasmin die Wasserwegsamkeit

[1]) Die vorliegende Arbeit wurde durch den schweizerischen Nationalfonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung unterstützt; wir möchten den zuständigen Behörden auch hier unseren Dank wiederholen.

und die wasserhaltende Kraft der Protoplasten, so daß die Tomatensprosse zunächst eine charakteristische Drosselung und hernach eine Übersteigerung ihrer Transpiration erfahren (GÄUMANN und JAAG, 1946, 1947; GÄUMANN, 1951, Abb. 460).

GÄUMANN, NAEF-ROTH und MIESCHER (1950) vermuten, daß diese Störungen im Wasserhaushalt der Tomatensprosse nicht nur durch das Lycomarasmin als solches ausgelöst werden, sondern auch dadurch, daß es im Stengel der Tomatensprosse Eisenionen komplex bindet und in Form des rund zehnmal giftigeren Lycomarasmin-Eisen-Komplexes in die Blätter verfrachtet. Dort werden die Eisenionen z. B. infolge der örtlichen Veränderungen des pH, ferner durch photochemische Effekte und durch kräftigere zelleigene Chelatbildner in Freiheit gesetzt oder abgetauscht, so daß im Zellinnern zwei Reaktionsketten nebeneinander herlaufen:

1. eine Kette der unmittelbaren Lycomarasminschädigungen; sie wird von den noch frei gebliebenen und den durch Verlust ihres Eisenions wieder regenerierten Lycomarasminmolekeln getragen, die z. B. den Enzymsystemen des Wirtes lebenswichtige Metallionen entziehen und dadurch örtliche Mangelschäden auslösen, und

2. eine Kette von Eisenschädigungen, indem ein Teil der Eisenionen, die vom Lycomarasmin als Vehikel in die Blätter verfrachtet wurden, im Zellinnern am „unrichtigen" Orte in Freiheit gelangt und dort örtliche Eisen-Überschwemmungsschäden verursacht (GÄUMANN und NAEF-ROTH, 1956).

Im Sektor der Störungen des Wasserhaushaltes der Tomatensprosse dürften von diesen zwei Effekten die Eisenschädigungen überwiegen. Läßt man nämlich abgeschnittene Tomatensprosse statt reines Lycomarasmin den 1 : 1 mit Eisen abgesättigten Lycomarasmin-Eisen-Komplex aufnehmen, so löst er (obschon er unterwegs keine wirtseigenen Eisenionen mehr aufnehmen kann) dieselbe charakteristische Kurve der Transpirationsstörung aus wie reines Lycomarasmin (GÄUMANN, KERN und SAUTHOFF, 1952; GÄUMANN, NAEF-ROTH und KERN, 1955).

Das Gegenteil tritt ein, wenn man das Lycomarasmin gegenüber Eisen abschirmt, so daß es einerseits kein Eisen mit sich führt und anderseits dennoch auf seinem Wanderungsweg durch den Sproß keine wirtseigenen Eisenionen aufnehmen kann. Diese Abschirmung geschieht in der Weise, daß man die Lycomarasminmolekeln vor ihrer Einführung in die Tomatensprosse im Verhältnis 1 : 1 mit Kupferionen absättigt; Kupferionen bilden ja stabilere Komplexe als Eisenionen und können deshalb durch die letzten nicht aus ihrer Lycomarasminbindung herausgedrängt werden. Läßt man nun die Tomatensprosse derart 1 : 1 mit Kupfer abgesättigtes Kupfer-Lycomarasmin aufnehmen, so zeigt die Transpiration der Tomatensprosse nur die anfängliche Drosselung des Wasserumsatzes (deren Ursache noch nicht bekannt ist), nicht aber die nachfolgende, nach unserer Arbeitshypothese auf der Eisenwirkung beruhende Übersteigerung desselben (KERN, 1956).

Diese Arbeitshypothese, wonach das Lycomarasmin nicht in erster Linie als solches die Wasserpermeabilität der Wirtsprotoplasten schädigt, sondern vorwiegend in Gestalt des Lycomarasmin-Eisen-Komplexes, kann leider nicht unmittelbar an Tomatengeweben überprüft werden; denn Tomatenprotoplasten eignen sich für Deplasmolyseversuche methodisch sehr schlecht. Nachdem es sich aber gezeigt hat, daß Fusarinsäure in steigender Konzentration die Wasserpermeabilität der Tomatenprotoplasten in gleichem Sinne schädigt wie die Protoplasten des Modellbeispieles *Rhoeo discolor* (Bachmann, 1956; Gäumann und Loeffler, 1956), möchten wir in der vorliegenden Arbeit unsere Arbeitshypothese an Hand von *Rhoeo discolor* überprüfen.

Unsere Versuchsfrage lautet demnach: In welcher Weise wird die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* a) durch reines Lycomarasmin und b) durch Lycomarasminlösungen, bei denen eine immer größere Zahl von Lycomarasminmolekeln mit Eisen-3- bzw. mit Kupfer-2-Ionen abgesättigt wurde, geschädigt? Der jeweilige Grad der Schädigung wurde nach der von Bachmann (1956) beschriebenen Methode auf Grund der Deplasmolysegeschwindigkeit bestimmt. Quotienten oberhalb 1 bedeuten eine Erhöhung der Wasserpermeabilität der Protoplasten, Quotienten unterhalb 1 eine Abdichtung derselben. Sämtliche Testlösungen wurden mit 0,1 n NaOH auf pH 5,2 eingestellt.

Reines Lycomarasmin schädigt in der Konzentration von 10^{-8} bis 10^{-2} molar die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* nicht. Die *Rhoeo*-Protoplasten verhalten sich demnach gegenüber dem reinen Lycomarasmin so, wie es für die Tomatenprotoplasten als Arbeitshypothese vermutet worden ist (Abb. 1).

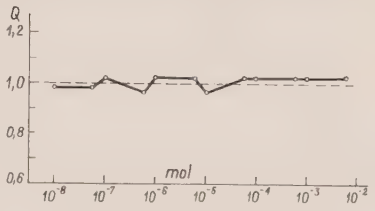


Abb. 1. Der Einfluß von Lycomarasmin in steigender Konzentration auf die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor*

Die Wirkung reiner Eisenionen auf die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten kann nicht geprüft werden, da das Eisen beim Eindringen in die Zellen als Hydroxyd ausfällt und die Plasmaporen verstopft.

Werden dagegen die Eisenionen zu einer Lycomarasminlösung gegeben, so cheliert im idealen Falle eine Lycomarasminmolekel ein Eisenion zum Lycomarasmin-Eisen-Komplex. Nach unserer eingangs besprochenen Arbeitshypothese vermag dieser Lycomarasmin-Eisen-Komplex, im Gegensatz zu den freien Eisenionen, in das Innere der Protoplasten zu dringen, wobei das Lycomarasmin als Vehikel dient, das giftige Eisenion mit sich verfrachtet und dann im Zellinnern zu einem großen Teil wieder verliert.

Zu einer 10^{-5} bzw. 10^{-3} molaren Lycomarasminlösung wurden deshalb steigende Mengen von Eisenchlorid $FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$ gegeben, und zwar im Verhältnis ein Eisenion auf 10^4 Lycomarasminmolekeln, ein Eisenion

auf 10^3 Lycomarasminmolekeln usw. (linker Flügel der Abszisse der Abb. 2). Beim Mischungsverhältnis $10^4 : 1$ hat somit im idealen Falle je eine von 10 000 Lycomarasminmolekeln ein Eisenion angelagert erhalten, beim Mischungsverhältnis $10^3 : 1$ je eine von 1000 Lycomarasminmolekeln usw. Beim Mischungsverhältnis 1 : 1 hat im idealen Falle jede Lycomarasminmolekel ein Eisenion cheliert und mit ihm den Lycomarasmin-Eisen-Komplex gebildet. Bis zu diesem 1 : 1-Verhältnis werden im idealen Falle sämtliche Eisenionen koordinativ, also (obschon das Lycomarasmin nur ein schwacher Chelatbildner ist) verhältnismäßig stabil an das Lycomarasmin gebunden.

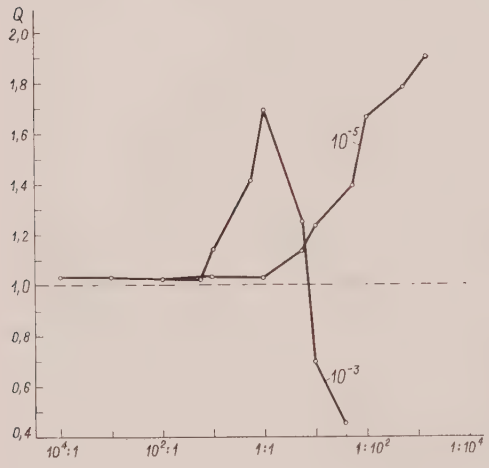


Abb. 2. Der Einfluß einer Lycomarasminlösung bei steigender Anlagerung von Eisenionen auf die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor*.

Abszisse: Verhältnis Lycomarasminmolekel zu Eisenionen. Die Konzentration der Lycomarasminlösungen betrug 10^{-5} bzw. 10^{-3} molar

Werden zu den Lycomarasminlösungen noch größere Mengen Eisenchlorid gegeben, nämlich 10 Eisenionen auf 1 Lycomarasminmolekel, 10^2 Eisenionen auf 1 Lycomarasminmolekel usw. (rechter Flügel der Abb. 2), so vermag das Lycomarasmin diese zusätzlichen Eisenionen nicht mehr koordinativ zu binden, sondern die „überschüssigen" Eisenionen gehen mit den Lycomarasmin-Eisen-Komplexen irgendwelche anderen, lockereren Bindungen ein und lösen sich dementsprechend auch wieder leichter von ihnen ab als die an das reine Lycomarasmin koordinativ gebundenen Eisenionen.

Welcher Natur diese zusätzlichen Bindungen sind, wissen wir als Botaniker nicht. Wir wissen nur, daß sie bestehen. Freie Eisenionen vermögen ja, wie soeben erwähnt, nicht in wesentlichen Mengen in das Zellinnere einzudringen. Die den Lycomarasmin-Eisen-Komplexen zusätzlich beigegebenen Eisenionen werden dagegen, wie wir gleich an Hand von Abb. 2 sehen werden, von diesen Komplexen mit in das Zellinnere verfrachtet: also müssen sie irgendwie mit ihnen verbunden sein.

Ferner wissen wir nicht, ob diese Anlagerung zusätzlicher Eisenionen an die Lycomarasmin-Eisen-Komplexe in vivo, also im Innern der Tomatenpflanzen, auch wirklich erfolgt bzw. ob diese Gebilde nicht sogleich wieder zerfallen und deshalb im Rahmen unserer Versuchsanordnung bloß experimentelle Artefakte darstellen; wir besprechen deshalb im folgenden den koordinativen und den nichtkoordinativen Bindungsbereich des eingebrachten Eisens getrennt.

a) Der koordinative Bindungsbereich der Eisenionen

Bei einer schwachen, nämlich 10^{-5} molaren Lycomarasminlösung ist die Anzahl Eisenionen, die im Zellinnern durch Störung der Gleichgewichte, durch Abtausch oder wegen des photochemischen Zerfalles der Lycomarasmin-Eisen-Komplexe in Freiheit gelangen, derart klein, daß in Abb. 2, Kurve 10^{-5}, im gesamten Bereich der koordinativen Bindung des Eisens keine meßbare Störung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten auftritt; damit stimmt überein, daß eine 10^{-5} molare Lycomarasminlösung auch in den Transpirationsversuchen, die von Gäumann und Jaag (1947, S. 27) mit abgeschnittenen Tomatensprossen durchgeführt wurden, keine charakteristischen Störungen des Wasserhaushaltes dieser Sprosse auszulösen vermochte.

Erhält dagegen eine 100mal stärkere, nämlich 10^{-3} molare Lycomarasminlösung steigende Mengen von Eisen-3-Ionen angelagert (Abb. 2, Kurve 10^{-3}), so reicht der nichttoxische Absättigungsbereich nur bis zum Mischungsverhältnis, bei welchem je eine von 50 Lycomarasminmolekeln ein Eisenion angelagert erhielt. Schon bei der nächstfolgenden Mischungsstufe, bei welcher je eine von 10 Lycomarasminmolekeln ein Eisenion chelierte, wird die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten deutlich übersteigert; diese Übersteigerung nimmt mit wachsender Zahl der angelagerten Eisenionen zu und erreicht beim Mischungsverhältnis 1 : 1, bei welchem also im idealen Falle jede Lycomarasminmolekel ein Eisenion gebunden hat, ihren Höhepunkt (Übersteigerung der Wasserpermeabilität auf den 1,7fachen Betrag). Mit diesem an *Rhoeo*-Protoplasten als Modellbeispiel gewonnenen Ergebnis stimmen auch die Transpirationsversuche, die Gäumann und Jaag (1947, S. 22) mit abgeschnittenen Tomatensprossen ausführten, überein, da bei ihnen eine 10^{-3} molare Lycomarasminlösung ebenfalls eine starke Übersteigerung der Transpiration auslöste.

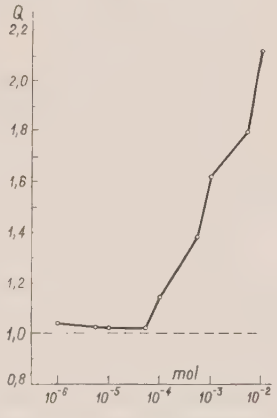


Abb. 3. Die Einwirkung verschieden konzentrierter Lycomarasminlösungen, die im Verhältnis 1 : 1 mit Eisenionen abgesättigt waren, auf die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor*.
Abszisse: Konzentration der verwendeten Lycomarasminlösungen in Molaritäten

In Abbildung 3 wurde versucht, die Lage der Wirkungsschwelle, bei der die in Freiheit gelangenden Eisenionen die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten meßbar zu stören beginnen, noch besser zu erfassen. Wir stellten eine Reihe von Lycomarasminlösungen zwischen den Konzentrationen von 10^{-6} und 10^{-2} molar her, sättigten sie im Verhältnis 1 : 1 mit Eisenionen ab und ließen sie auf *Rhoeo*-Protoplasten einwirken.

Der Knickpunkt der Wirkungskurve liegt in Abbildung 3 bei der Lycomarasminkonzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ molar; die in Abbildung 2, Kurve

10^{-5} molar, verwendete Lycomarasminlösung liegt also hart an der Grenze der Schädigungsschwelle. Vom Knickpunkt weg nimmt in Abbildung 3 die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten allmählich bis auf über den doppelten Betrag zu. Es bestätigt sich somit,

1. daß der Lycomarasmin-Eisen-Komplex, im Gegensatz zum reinen Lycomarasmin, die Wasserpermeabilität der Wirtsprotoplasten mit zunehmender Konzentration in zunehmendem Maße schädigt, und

2. daß diese Schädigung in dem hier zur Diskussion stehenden Konzentrationsbereich in einer Übersteigerung der Wasserpermeabilität der Protoplasten besteht.

b) Der nichtkoordinative Bindungsbereich der Eisenionen

Werden dem 10^{-5} molaren Lycomarasmin-Eisen-Komplex steigende Mengen von Eisenionen angelagert, so übersteigern die im Zellinnern in Freiheit gelangenden Eisenionen die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten bis auf rund den 1,9fachen Betrag (Abb. 2, Kurve 10^{-5}). Diese nichtkoordinativ gebundenen und nunmehr wieder abgelösten Eisenionen wirken somit in gleichem Sinne auf die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten ein wie bei der 100mal stärkeren Lycomarasminlösung (Abb. 2, Kurve 10^{-3} molar) die koordinativ gebundenen, aber nun doch allmählich im Übermaß zur Auswirkung gelangenden Eisenionen; dabei liegen die absoluten Eisenkonzentrationen, bei denen die Übersteigerung der Wasserpermeabilität einsetzt, in beiden Kurven der Abb. 2 in der gleichen Größenordnung: $0{,}5 \cdot 10^{-4}$ molar Eisen bei der Kurve 10^{-5} und 10^{-4} molar Eisen bei der Kurve 10^{-3}.

Wenn dagegen die Lösung 100mal mehr Lycomarasminmolekeln und dementsprechend bei der 1 : 1-Absättigung 100mal mehr Lycomarasmin-Eisen-Komplexe enthält, und wenn nun diesen Lycomarasmin-Eisen-Komplexen auch wieder steigende Mengen von Eisenionen angelagert werden, dann überschreitet offenbar die Menge der Eisenionen, die sich im Zellinnern ablösen, den Wirkungsbereich für die Übersteigerung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten, und es erfolgt nunmehr eine zunehmende Abdichtung derselben. In Abb. 2, Kurve 10^{-3} molar, ändert denn auch die Schädigung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten gleich nach dem Durchschreiten des koordinativen Bindungsbereiches (Mischungsverhältnis 1 : 1) ihren Richtungssinn und läßt die Wasserpermeabilität bei der Anlagerung von 50 Eisenionen an einen Lycomarasmin-Eisen-Komplex auf weniger als den halben Betrag absinken. Es wird hier vermutlich ein Teil der Eisenionen von den Lycomarasmin-Eisen-Komplexen abgelöst und als Hydroxyd usw. ausgefällt, wodurch eine Verstopfung der submikroskopischen Wasserwege und eine Herabsetzung der Wasserpermeabilität der Protoplasten eintritt.

Die Wirkung der Eisenionen, die nichtkoordinativ an den Lycomarasmin-Eisen-Komplex gebunden sind, hängt somit nach Art und Ausmaß von der Menge des angebotenen Eisens ab. Doch möchten wir darauf ver-

zichten, hierüber zahlenmäßige Betrachtungen anzustellen; denn wir sind für das biochemische und physiologische Problem der Giftigkeit der Eisenionen nicht zuständig und wissen auch nicht, ob diese Eisenverbindungen des Lycomarasmin-Eisen-Komplexes überhaupt biologische Realitäten darstellen.

c) Die Absättigung des Lycomarasmins mit Kupferionen

Um das Bild zu runden, führten wir einige Versuche durch, bei welchen an die Lycomarasminmolekeln vor ihrem Eindringen in die Wirtszellen statt der Eisen-3-Ionen steigende Mengen der stabileren Kupfer-2-Ionen angelagert wurden.

Reine Cu-2-Ionen setzen die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten schon in geringsten Mengen herab (Abb. 4).

Werden die Kupferionen in eine Lycomarasminlösung gegeben, so lagert sich jede Lycomarasminmolekel ein Kupferion zum Lycomarasmin-Kupfer-Komplex an. Diese Lycomarasmin-Kupfer-Komplexe werden, wie die entsprechenden Lycomarasmin-Eisen-Komplexe, im Zellinnern der Versuchspflanzen zu einem gewissen Prozentsatz wieder gelöst, so daß eine Anzahl Kupferionen in Freiheit gesetzt oder an kräftigere Chelatbildner gebunden wird. Da jedoch der Kupfer-Lycomarasmin-Komplex weit stabiler ist als der Eisen-Lycomarasmin-Komplex (Gäumann und Naef-Roth, 1956), so ist die Menge der freigesetzten oder abgetauschten Kupferionen sicher wesentlich geringer als diejenige der Eisenionen; dafür wirken die Kupferionen weit giftiger als die Eisenionen (Gäumann und Naef-Roth, 1956).

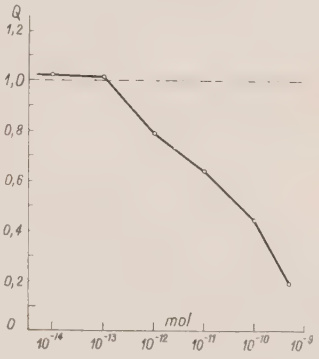


Abb. 4. Der Einfluß von $CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$ in steigender Konzentration auf die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor*

In stark verdünnten Lycomarasminlösungen, die wegen ihrer geringen Konzentration ohnehin nur eine verhältnismäßig geringe Zahl von Lycomarasmin-Kupfer-Komplexen bilden können (so bei der Lycomarasminkonzentration von 10^{-5} molar), ist die Zahl der im Zellinnern zur Auswirkung gelangenden Kupferionen derart klein, daß sie die Wirkungsschwelle für eine meßbare Schädigung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protopla-

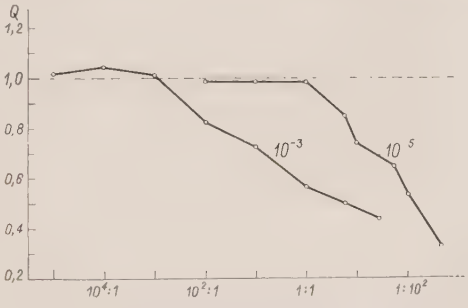


Abb. 5. Der Einfluß einer Lycomarasminlösung bei steigender Anlagerung von Kupferionen auf die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor*. Abszisse: Verhältnis Lycomarasminmolekel zu Kupferionen. Die Konzentration der Lycomarasminlösungen betrug 10^{-5} bzw. 10^{-3} molar

sten nicht überschreiten. Die Lycomarasmin-Kupfer-Lösungen sind deshalb in Abbildung 5, Kurve 10^{-5} molar, wie die entsprechenden Lycomarasmin-Eisen-Lösungen in Abbildung 2, Kurve 10^{-5} molar, im gesamten Bereich der koordinativen Bindung des Kupfers ungiftig.

Erst im nichtkoordinativen Bindungsbereich, also bei der zusätzlichen Anlagerung von Kupferionen an den Lycomarasmin-Kupfer-Komplex, beginnen die sich ablösenden Kupferionen die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten meßbar zu schädigen, wobei die Schädigungskurve ungefähr gleich verläuft wie wenn die Kupferionen in Gestalt des reinen Kupferchlorides (Abb. 4) appliziert worden wären. In 10^{-5} molar verdünnten Lycomarasminlösungen vermögen somit bloß die zusätzlich an die Lycomarasmin-Kupfer- bzw. an die Lycomarasmin-Eisen-Komplexe angelagerten Schwermetallionen die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten zu schädigen, wobei sich die Schädigungsrichtung entgegengesetzt gestaltet: Die von den entsprechenden Komplexen sich ablösenden Kupferionen führen zu einer Abdichtung der *Rhoeo*-Protoplasten, die sich ablösenden Eisenionen zu einer Erhöhung ihrer Wasserpermeabilität.

Doch scheint die Zahl der koordinativ gebundenen Kupferionen, die bei einer 10^{-5} molaren Konzentration der Lycomarasmin-Kupfer-Komplexe im Zellinnern zur Auswirkung gelangen, bereits dicht vor der Schädigungsschwelle zu liegen. Werden nämlich steigende Mengen von Kupferionen zu einer 100× konzentrierteren, also 10^{-3} molaren Lycomarasminlösung gegeben, die ceteris paribus auch 100× mehr Kupferionen mit sich verfrachten kann, so beginnen die *Rhoeo*-Protoplasten schon beim Mischungsverhältnis $10^2 : 1$, wo je eine von 100 Lycomarasminmolekeln ein Kupferion cheliert hat, Schädigungen zu zeigen (Abb. 5, Kurve 10^{-3} molar). Rein zahlenmäßig enthält eine 1 : 1 mit Kupfer abgesättigte 10^{-5} molare Lycomarasminlösung gleich viel Kupferionen wie eine im Verhältnis von 100 Lycomarasminmolekeln zu 1 Kupferion abgesättigte 10^{-3} molare Lycomarasminlösung. Wenn also die *Rhoeo*-Protoplasten bei der letzteren dennoch Schaden zu nehmen beginnen und bei der ersteren noch nicht, so läßt dies vermuten, daß wir uns in einem labilen Grenzbereich befinden, wo schon kleine Gleichgewichtsverschiebungen genügen, um meßbare Effekte auszulösen.

Diese schädigenden Effekte des Kupfers bestehen wiederum, wie bei den Kupfersalzen der Abb. 4 und wie bei der Kurve 10^{-5} molar der Abb. 5, in einer zunehmenden Abdichtung der *Rhoeo*-Protoplasten. Im Transpirationsversuch mit reinen Kupfersalzen läßt sich freilich diese Abdichtung bei Tomatensprossen nicht nachweisen; falls sie dort ebenfalls eintritt, wird sie vermutlich durch eine andersartige Wirkung der Kupferionen überlagert, die in einem bestimmten Konzentrationsbereich zu einer starken Übersteigerung der Transpiration führt (KERN, 1956).

d) Allgemeine Betrachtungen

Die hier vorgelegten, am Modellbeispiel der *Rhoeo discolor* gewonnenen Messungen unterstützen die Arbeitshypothese von GÄUMANN und NAEF-ROTH (1956), wonach das Lycomarasmin im Sektor der Permeabilitätsstörungen vorwiegend als Vehikel dient und im Sproß der Tomatenpflanzen wirtseigene Eisenionen cheliert und in die Blätter verfrachtet, wo sie abgetauscht oder abgelöst werden und bei den Konzentrationen, die normalerweise zu erwarten sind, eine Übersteigerung der Permeabilität der Protoplasten und der Transpiration der Sprosse bewirken. Hieraus ergeben sich zwei Konsequenzen.

1. Der Desensibilisierungseffekt. Läßt man Tomatensprosse am ersten Versuchstag eine bestimmte Menge Lycomarasmin aufnehmen und am darauffolgenden zweiten Versuchstag wieder eine bestimmte Menge dieses Toxines, so fällt in einem bestimmten Versuchsbereich die durch die überlagernde zweite Dosis ausgelöste Schädigung kleiner aus als wenn diese Dosis als Primärdosis am ersten Versuchstag verabreicht worden wäre. Es sieht aus, als ob die Tomatenpflanzen durch die primäre Toxingabe „desensibilisiert" worden wären (GÄUMANN und NAEF-ROTH, 1953).

Auf Grund der hier besprochenen Lycomarasmin-Eisen-Theorie ist es möglich, sich über den Mechanismus dieser „Desensibilisierung" eine Vorstellung zu machen: Ein Teil des Desensibilisierungseffektes beruht darauf, daß die Primärdosis des Lycomarasmins einen großen Teil der chelierbaren wirtseigenen Eisenionen mit sich wegführte, so daß die überlagernde zweite Dosis des Lycomarasmins nur noch wenige Eisenionen vorfand und deshalb in diesem Wirkungssektor ihrer Wirkungsgrundlage beraubt war.

2. Der Einfluß der Eisenernährung der Tomatenpflanzen auf ihre Lycomarasminempfindlichkeit. Wenn ein Teil der Giftwirkung des Lycomarasmins wirklich darauf beruht, daß es auf seinem Wanderungswege durch den Sproß wirtseigene Eisenionen cheliert und in die Blätter verfrachtet, dann muß die pathogene Wirkung ein und derselben Lycomarasmindosis bei verschieden mit Eisen ernährten Tomatenpflanzen verschieden sein. Wir werden hierüber in einer späteren Arbeit berichten.

Zusammenfassung

Ein Teil der pathogenen Wirkung des Lycomarasmins auf Tomatenpflanzen beruht offenbar darauf, daß die Lycomarasminmolekeln auf ihrem Wanderungswege durch die Tomatensprosse wirtseigene Eisenionen, die ja an sich nicht wanderungsfähig wären, chelieren und in Gestalt des Lycomarasmin-Eisen-Komplexes in die Blätter verfrachten. Hier zerfällt ein Teil dieser Lycomarasmin-Eisen-Komplexe z. B. wegen photochemischer Effekte oder wegen eines Abtausches des Eisens durch kräftigere zelleigene Chelatbildner. Dadurch wird einerseits ein Teil der Lycomarasminmolekeln wieder

als Chelatbildner regeneriert und löst entsprechende örtliche Mangelschäden aus; und anderseits führen die am „unrichtigen" Orte in Freiheit gesetzten Eisenionen zu örtlichen Eisen-Überschwemmungsschäden. GÄUMANN und NAEF-ROTH (1956) vermuten, daß die Übersteigerungen der Transpiration, welche im Gefolge der Lycomarasminvergiftung auftreten, vorwiegend auf derartige Eisenschädigungen zurückgehen.

Da diese Vermutung wegen methodischer Schwierigkeiten nicht unmittelbar an Tomatengeweben überprüft werden kann, wurden in der vorliegenden Arbeit entsprechende Versuche mit den Protoplasten von *Rhoeo discolor* als Modellbeispiel durchgeführt. Reines Lycomarasmin schädigt, wie für die Tomatensprosse als Arbeitshypothese vermutet worden war, die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten nicht. Steigende Mengen von Eisenionen, die mit dem Lycomarasmin als Vehikel in das Innere der *Rhoeo*-Protoplasten eingebracht werden, bewirken dagegen im biologisch sinnvollen Konzentrationsbereich eine Übersteigerung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten. Die eingangs genannte Arbeitshypothese wird somit durch die Messungen an *Rhoeo*-Protoplasten gestützt.

Durch diese Bestätigung der genannten Arbeitshypothese findet die „Desensibilisierung" der Tomatensprosse bei wiederholter Applikation von Lycomarasmin eine teilweise Erklärung. Läßt man nämlich einen Tomatensproß an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmte Mengen von Lycomarasmin aufnehmen, so wirkt die überlagernde zweite Dosis schwächer als die entsprechende erste Dosis. Die Ursache mag zum Teil darin liegen, daß die Primärdosis des Lycomarasmins einen großen Teil der chelierbaren wirtseigenen Eisenionen mit sich wegführte, so daß die überlagernde zweite Dosis nur noch wenige Eisenionen vorfand und deshalb in diesem Wirkungssektor ihrer Wirkungsgrundlage beraubt war.

Summary

The pathogenic effect of lycomarasmin is partly due to the fact that the molecules of lycomarasmin on their way through the tomato shoots chelate iron ions of the host, which would not themselves be able to migrate, and transport them into the leaves in form of the lycomarasmin-iron complex. Here part of the lycomarasmin-iron complexes are decomposed e. g. on account of photochemical effects or because of being exchanged by more potent chelating agents of the cell itself. Thus, on the one hand part of the lycomarasmin molecules are regenerated as chelating agents and cause appropriated local deficiencies; on the other hand, iron ions set free in the „wrong" place lead to local iron plethora. GÄUMANN and NAEF-ROTH (1956) assume that the excessive transpiration occuring in consequence of lycomarasmin poisoning is mainly due to such iron injuries.

If cut tomato shoots are allowed to take in the lycomarasmin-iron-complex saturated with iron 1 : 1 they show the same characteristic curve

of disturbed transpiration as they do with pure lycomarasmin although the saturated lycomarasmin-iron-complex cannot chelate iron ions of the host on the way (GÄUMANN, KERN and SAUTHOFF 1952). The opposite occurs if lycomarasmin is shielded from iron so that on the one hand it carries no iron and on the other hand it cannot chelate on its way through the shoot iron ions of the host. In this case the transpiration of the tomato shoots does not show the characteristic curve of lycomarasmin injuries (KERN 1956). Hence lycomarasmin without iron is without effect in the field of excessive transpiration.

This assumption, that the iron ions of the host transported by lycomarasmin to the „wrong" place play an important part in the disturbing of the water economy of tomato shoots cannot be verified in tomato tissues themselves, owing to methodical difficulties. For this reason analogous experiments were carried out with protoplasts of *Rhoeo discolor* as a model. Pure lycomarasmin does not impair the water permeability of *Rhoeo* protoplasts, as had been taken for a working hypothesis with tomato shoots. An increase in the number of iron ions, which are carried into the interior of the *Rhoeo* protoplasts with lycomarasmin as a vehicle, produces in the biologically sensible concentration area an excess of the water permeability of the *Rhoeo* protoplasts. The working hypothesis mentioned at the beginning is therefore borne out by the measurements with *Rhoeo* protoplasts.

By this confirmation of the working hypothesis the desensitization of tomato shoots after repeated application of lycomarasmin can be partly explained. If a tomato shoot is allowed to take in a certain amount of lycomarasmin on two successive days, the additioned second dose produces a smaller effect than the first. This may be partly due to the fact that the first dose of lycomarasmin carried away a great percentage of the chelatable iron ions so that the second dose met with only a few iron ions.

Literaturverzeichnis

BACHMANN, E. (1956): Der Einfluß von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopath. Z., **27**, 255—288.

GÄUMANN, E. (1951): Pflanzliche Infektionslehre. 2. Auflage. Birkhäuser, Basel, 681 S.

— —, und O. JAAG (1946): Über das Problem der Welkekrankheiten bei Pflanzen. Experienta, **2**, 215—220.

— —, und — — (1947): Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens I bis III. Ber. Schweiz. Bot. Ges., **57**, 3—34, 132—148, 227—241.

— —, H. KERN, und W. SAUTHOFF (1952): Untersuchungen über Welketoxine. Phytopath. Z., **18**, 404—415.

— —, und W. LOEFFLER (1956): Über die Wirkung von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität der Markzellen von Tomatenpflanzen. l. c. **28**, 319—328.

— —, und ST. NAEF-ROTH (1953): Über einen mutmaßlichen Desensibilisierungseffekt bei einem Welketoxin. l. c., **20**, 133—166.

GÄUMANN, E., und ST. NAEF-ROTH (1956): Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. IV. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Absättigung mit verschiedenen Schwermetallionen. l. c., **25**, 418—444.

— —, — —, und H. KERN (1955): Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. III. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Absättigung mit Eisenionen. l. c., **24**, 373—406.

— —, — —, und G. MIESCHER (1950): Untersuchungen über das Lycomarasmin. l. c., **16**, 257—288.

KERN, H. (1956): Der Einfluß des Lycomarasmin-Kupfer-Komplexes auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomatensprosse. l. c., **27**, 55—59.

LINSKENS, H. F. (1955): Der Einfluß der toxigenen Welke auf die Blattausscheidungen der Tomatenpflanze. l. c., **23**, 89—106.

SANWAL, B. D. (1956): Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. l. c., **25**, 333—384.

Istituto di Patologia Vegetale Bologna, Italia
Direttore: Prof. G. Goidànich

Il saggio „in vivo" degli anticrittogamici

di

Bruno Casarini

Con 3 figure

I metodi usati per le prove d'attività degli anticrittogamici in laboratorio sono molteplici ed in continua evoluzione, nella ricerca di procedimenti semplici e rapidi che garantiscano una sufficiente attendibilità dei risultati.

La metodologia che si segue consiste essenzialmente nel far germinare su un substrato inerte dei conidi di funghi-test in presenza di quantità volute della sostanza da saggiare; l'attività tossica di questa viene poi espressa dal potere di inibizione della germinazione dei conidi.

Il procedimento più frequentemente seguito consiste nello spruzzare — con attrezzature più o meno complesse e con modalità varie (1—9—10), ma che tendono in ogni caso ad ottenere la massima uniformità e regolarità di spruzzamento — una sospensione della sostanza in esame su appositi vetrini che si lasciano poi asciugare e sui quali vengono, in seguito, depositate delle gocce di sospensione di conidi di cui, dopo un appropriato intervallo di tempo, viene controllata la percentuale di germinazione.

Meno di frequente (3—12), è preparata una sospensione titolata contenente contemporaneamente antiparassitario e conidi, che viene poi distribuita in goccie pendenti o poggiate su substrato inerte.

I funghi-test di più comune impiego sono: *Alternarie* del tipo *tenuis*, *Alternaria oleracea*, *Macrosporium sarcinaeforme*, *Fusicladium dendriticum*, ecc.

Tutti questi metodi di saggio — dunque — hanno svolgimento in un ambiente molto differente da quello naturale, che incide negativamente sull'attendibilità dei risultati.

Gli aspetti più particolarmente criticabili sono i seguenti:

1) Come materiale biologico di saggio ci si serve di micro-organismi (i funghi-test suaccennati) che, se presentano vantaggi di una maggiore facilità di coltivazione e di una maggiore copia di elementi di riproduzione su cui — inoltre — più evidenti appaiono gli effetti dell'azione tossica dei fitofarmaci, possono essere distanti sistematicamente e, di riflesso, fisiologicamente dai micro-organismi fitopatogeni. Fatto che assume fondamentale importanza da quando è chiaramente apparso che i nuovi prodotti di sintesi presentano di norma una netta specificità d'azione (8).

Già altri sperimentatori hanno tentato di ovviare a tale inconveniente; come, ad esempio, BORZINI (4) che operava con conidi di *Plasmopara viticola* messi a germinare su vetrini spruzzati con pompette a mano, ed ORSENIGO (13) che faceva germinare i conidi dello stesso fungo entro le stesse sospensioni di antiparassitario.

In questi metodi rimane incerta la valutazione dell'effetto tossico della sostanza in prova in quanto questa agisce sia sui conidi della Peronospora (uccidendoli prima della fuoriuscita delle zoospore) che sulle zoospore stesse; e, mentre la determinazione delle percentuali di conidi non germinati è facile e sicura, la determinazione della percentuale di zoospore morte si presenta difficile ed incerta.

E' vero che i suddetti AA., oltre al grado di germinazione dei conidi, ponevano attenzione anche al grado di mobilità delle zoospore ed anche all'aspetto del protoplasma delle stesse; ma questo sistema di valutazione ci pare di difficile realizzazione sia perchè le zoospore in tali condizioni artificiali presentano spesso una vitalità assai ridotta anche in acqua pura, sia perchè i conidi germinano più o meno scalarmente cosicchè l'esame del grado di germinazione di questi dovrebbe essere fatto dopo parecchie ore.

Noi annettiamo una particolare importanza alla possibilità di una sicura valutazione dell'effetto tossico diretto sulle zoospore in quanto nostre prove ripetute ci fanno escludere che esista, per i diversi principi chimici, proporzionalità tra il potere di inibizione di germinazione dei conidi e la tossicità nei confronti delle zoospore.

2) L'antiparassitario viene posto fuori da quelle condizioni (dipendenti dalla pianta e dall'ambiente) che in natura ne possono accrescere o diminuire l'attività tossica. Infatti esistono prodotti con scarsa attività nella loro composizione iniziale, ma che si trasformano in composti assai attivi quando sono portati sulla pianta, mentre esistono sostanze che sulla pianta divengono di scarsa solubilità e quindi di efficacia molto lenta.

3) Nello spruzzamento dei vetrini, anche se effettuato con gli appositi banchi di nebulizzazione, varia la quantità di prodotto che si deposita su di essi (6—11) col variare della natura fisico-chimica dei composti stessi; in tal modo, si hanno per prodotti di natura diversa dei risultati che non sono confrontabili, a meno che non si ricorra, volta per volta, a determinazioni chimiche assai complesse.

4) Nella deposizione delle gocce di sospensione di conidi, è assai difficile riuscire a depositare su eguali superfici un volume liquido di eguale dimensione.

Gli ultimi due inconvenienti, sommati alla complessità ed al notevole costo delle apparecchiature di nebulizzazione, fanno sì che ancor oggi sia usato frequentemente il metodo della sospensione contenente conidi ed antiparassitario, che viene a sua volta distribuita in goccie. Ma anche questo metodo si presta bene solo per i prodotti solubili (3); per i prodotti in sospensione, che sono la maggior parte di quelli che ci interessano, al fine di evitare la deposizione delle singole particelle, occorre mantenere la sospensione in continuo scuotimento finchè questa non è stata distribuita in gocce,

ed anche così operando si ha una scarsa uniformità di distribuzione nell'ambito delle gocce stesse.

Anche noi abbiamo tentato — sfruttando, naturalmente, la esperienza negativa e positiva di chi ci ha preceduto — di mettere a punto un metodo di saggio in cui fossero eliminati o ridotti al minimo gli inconvenienti accennati. Più particolarmente abbiamo cercato un nuovo metodo che rispondesse ai requisiti seguenti:

1°) Semplice e rapida applicazione, al fine di rendere possibile il saggio di molti prodotti chimici in poco tempo e con relativamente modesto dispendio economico.

2°) Impiego di un patogeno come fungo test.

3°) Operazione in ambiente simile a quello in cui l'antiparassitario ed il fungo test agiscono in pratica; ed, in particolare, svolgimento del saggio su substrato vivente.

4°) Massima uniformità e regolarità nella esecuzione.

Il metodo da noi seguito consiste nel mettere a contatto una quantità voluta di elementi riproduttivi di un fungo fitopatogeno (nel nostro caso la *Plasmopara viticola*) con l'antiparassitario di cui s'intende saggiare l'efficacia in dovuta ed uniforme sospensione acquosa; sospensione che viene poi distribuita sulle foglie della pianta ospite mantenute in condizioni ideali per ottenere l'attecchimento dell'infezione da parte dei germi che sono sfuggiti all'azione tossica del fitofarmaco.

In tale modo, è assicurata la costanza del rapporto tra quantità di antiparassitario, numero di conidi e volume di acqua di diluizione; viene assicurato l'uniforme contatto tra i conidi e l'antiparassitario; il fungicida viene posto in condizioni prossime a quelle naturali, almeno durante l'intervallo di tempo intercorrente tra la nebulizzazione e l'infezione.

Più particolarmente il metodo di saggio si realizza secondo le seguenti modalità.

Si preparano tre sospensioni di un antiperonosporico noto che deve servire come termine di confronto. A tale uopo può servire sia un prodotto cuprico — a noi è parso preferibile alla poltiglia bordolese standard (2) un prodotto a composizione costante e di facile uso, quale un ossicloruro — che un prodotto acuprico. Nel caso di prodotto cuprico si prendono come termini di confronto tre diluizioni corrispondenti a un titolo di rame di circa:

$$^1/_{100\,000};\ ^1/_{200\,000};\ ^1/_{400\,000}.$$

Nel caso di un prodotto acuprico a base di etilenbisditiocarbammato di zinco e con l' 80 % di principio attivo si possono prendere come termini di confronto le diluizioni di:

$$^1/_{30\,000};\ ^1/_{60\,000};\ ^1/_{120\,000}$$ circa di prodotto commerciale.

A tali concentrazioni di antiparassitario corrispondono sempre infezioni peronosporiche di intensità compresa tra il valore nullo ed il valore raggiunto sulle foglie testimonio inoculate con sospensione pura di conidi.

Si preparano quindi per ogni prodotto da esaminare tre diluizioni rispettivamente al:

$$^1/_{10\,000};\quad ^1/_{30\,000};\quad ^1/_{90\,000}.$$

Si portano in altrettante provette 10 o più cc. (secondo la quantità di foglie che si vorranno inoculare) di ognuna delle sospensioni preparate ed in un'altra provetta si pone un egual volume di acqua distillata.

Si prepara poi una sospensione di conidi di cui viene controllata la densità alla cella Thoma e che viene portata alla diluizione di 50 000 elementi per cc. (si opera sempre con conidi a germinabilità altissima ottenuti da foglie con macchie d'olio ben lavate e messe in camera umida a 20—22 ° C., uno o due giorni prima).

Fig. 1. Batteria di scatole Petri contenenti foglie di vite su cui vengono eseguiti saggi della efficacia degli antiparassitari. Per una migliore conservazione delle foglie, le scatole vengono aperte, per una decina di minuti, due volte al giorno

Di poi si aggiunge alle provette contenenti le sospensioni di anticrittogamico ed a quella contenente acqua distillata, un egual volume di sospensione conidica. Si ha così una sospensione di conidi in acqua (controllo) contenente 25 000 conidi per cc. e tante sospensioni di conidi in antiparassitario, con un tenore di quest'ultimo metà di quello che si aveva nelle diluizioni iniziali.

Queste sospensioni vengono quindi spruzzate, con un comune nebulizzatore di vetro[1]), su foglie di vite poste in una delle seguenti condizioni:

a) Foglie di vite poste in ambiente ad umidità satura e con il picciolo immerso nell'acqua. L'ambiente (che può essere facilmente ottenuto con plastica trasparente) viene arieggiato per dieci minuti due volte al giorno.

[1]) I primi saggi, di cui fu data notizia in altra sede (7), furono effettuati ricorrendo al sistema della sospensione contenente antiparassitario e conidi che veniva poi depositata in gocce su foglie di vite su pianta. Anche in tal modo si erano avuti risultati promettenti, ma il sistema della nebulizzazione permette una valutazione più precisa.

b) Foglie di vite contenute in scatole Petri ad umidità satura (l'umidità viene creata con un foglio di carta bibula applicata al coperchio). Questo sistema dà buoni risultati quando si dispone di foglie ben sviluppate e non troppo giovani, nè troppo vecchie. Ponendo le foglie in camera umida alla sera ed inoculandole il mattino successivo, alla luce, si ha generalmente una sufficiente apertura di stomi, quasi come nel caso precedente. Come nel caso precedente, le foglie vengono arieggiate per dieci minuti due volte al giorno (fig. 1).

c) Rami di vite posti sotto ampie campane di vetro ad umidità satura. Questo sistema è preferibile quando si abbiano pochi prodotti da esaminare e si abbia sulle viti in allevamento una abbondante produzione di femminelle con foglie, anche non molto sviluppate, purchè ugali.

d) Piante di vite poste entro ampie camere d'incubazione ad umidità satura. Questo sistema è preferibile quando si disponga di un gran numero di viti poste in vaso e scarsamente sviluppate. Occorre però disporre di almeno un tralcio per ogni tesi in esame; occorre inoltre avere tralci a sviluppo, anche scarso, ma ugale.

Fig. 2. Filare di viti coperte con un ampio tetto di plastica: le foglie sono in tal modo protette dalle infezioni peronosporiche senza alcun trattamento anticrittogamico

Il materiale da inoculare si ottiene bene, durante l'estate, allevando viti all'aperto sotto ampi tetti di plastica (fig. 2); durante l'inverno bisogna invece ricorrere all'allevamento di piccole piante in vaso in serra. In ogni caso bisogna conservare le piante sane da oidio.

Le foglie staccate vengono inoculate poggiandole su una tavola inclinata in modo da poter dirigere lo spruzzo perpendicolarmente alla pagina inferiore. Il nebulizzatore viene tenuto a distanza di circa 40 cm. dalle foglie. Anche nel caso di foglie portate da rami, si cerca di disporle sullo stesso piano e di inocularle nel modo suddetto. Nel caso di piante contenute in vaso, la inoculazione riesce più difficile e meno regolare; in particolare occorre isolare, durante lo spruzzamento, i singoli tralci con schermi.

Nello spruzzamento si segue, per ogni prodotto, l'ordine delle concentrazioni crescenti; si procede così al lavaggio del nebulizzatore solo al passaggio da un prodotto all'altro. Procedendo con sollecitudine e preordi-

nando le operazioni in tutti i loro particolari, due operatori riescono — per un saggio di tre prodotti — a condurre a termine lo spruzzamento in 5 minuti e nell'intervallo di 12—15 minuti dal momento in cui viene eseguita la sospensione di conidi.

La scelta di uno dei sistemi suddetti va fatta, caso per caso, in base al numero di prodotti da provare, alla precisione richiesta nei risultati, ed alla disponibilità di materiale da inoculare.

Particolarmente nel caso di inoculazioni su foglie staccate dalla pianta, occorre che queste siano tenute in ambiente a temperatura di 20—23 ^{0} C. in modo da avere una durata minima del periodo di incubazione della peronospora.

In ogni caso, dopo circa 24 ore dall'inoculo, si lasciano asciugare completamente le foglie.

Due giorni dopo la comparsa delle prime fruttificazioni conidiche, si procede alla valutazione dell'intensità della infezione. Tale valutazione viene fatta riferendo l'intensità di infezione ad una scala da noi stabilita e di cui viene data una rappresentazione fotografica (fig. 3).

Questa prima serie di prove ci permette generalmente di avere — per i prodotti in prova e per il prodotto di confronto — delle infezioni peronosporiche fra loro confrontabili.

Nei casi in cui si avessero per tutte e tre le diluizioni del prodotto in prova delle infezioni maggiori di quelle corrispondenti al prodotto di confronto alla diluizione più spinta, il prodotto in prova potrà essere provato a concentrazioni maggiori, pure essendo già apparsa evidente la sua scarsa efficacia.

Il ragionamento contrario vale per il caso in cui il prodotto in prova si dimostri, a tutte e tre le concentrazioni, più efficace del prodotto di confronto nella sua concentrazione maggiore.

Negli altri casi, cioè quando le infezioni peronosporiche ottenute col prodotto in esame corrispondono ad infezioni ottenute col prodotto noto, si può esprimere — dal confronto diretto — un giudizio sulla rispettiva efficacia fungitossica.

In tal modo, la efficacia dei prodotti in esame viene sempre espressa in rapporto alla efficacia di un prodotto noto. E' impossibile — anche seguendo la massima uniformità di operazioni — esprimere l'efficacia di un prodotto con un dato assoluto quale potrebbe essere la concentrazione critica (e cioè la concentrazione più bassa che riesce ad inibire l'infezione) in quanto questa varia generalmente nelle singole prove e ciò forse, in particolare, in dipendenza del grado di sensibilità degli zoosporangi che vengono usati nelle singole prove.

Le prove vanno ripetute più volte ed i risultati sono da ritenersi attendibili solo quando si hanno evasioni la cui intensità cresce regolarmente per le diluizioni successive.

Fig. 3. Rappresentazione fotografica di una scala di intensità di infezioni peronosporiche a cui ci si riferisce nella valutazione delle infezioni ottenute con inoculo di sospensioni di conidi contenenti determinate quantità di antiparassitario

Questo metodo di saggio serve principalmente per una prima rapida selezione dei prodotti dotati di attività anticrittogamica da quelli sprovvisti di tale qualità.

Quando si desidera valutare con maggior precisione il rapporto di efficacia fra i diversi prodotti, è necessario ricorrere ad un maggior numero di diluizioni (generalmente bastano cinque) e con intervalli più stretti fra l'una e l'altra diluizione. Inoltre i prodotti da saggiare devono essere confrontati, in questo ultimo caso, con un prodotto di cui sia noto il potere fungitossico ed avente la stessa natura chimica ed eguale meccanismo d'azione. Infatti nel caso di prodotti che diversificano da quest'ultimo punto di vista, ad eguale potere fungitossico nelle prove di laboratorio, non corrisponde sempre un'eguale efficacia pratica. Nelle prove di laboratorio risulta, per esempio, per uno Zineb all'80 % di principio attivo espresso come „Aspor", un potere tossico che è — ad eguali concentrazioni — minore di quello dell'ossicloruro di Cu e Ca al 40 % di Cu (nel rapporto di 3/4), mentre in pratica si ha un'efficace difesa della vite con una dose di acuprico corrispondente circa alla metà di quella necessaria per l'ossicloruro; ciò è forse dovuto, in particolare, alla maggiore prontezza di azione del prodotto acuprico rispetto a quello rameico in cui la sostanza attiva va — nelle condizioni naturali — in soluzione con molta lentezza.

Ripetiamo però che lo scopo fondamentale del metodo di saggio da noi prospettato[1]) è quello di permettere una prima selezione dei prodotti che possiedono un certo grado di fungitossicità da quelli che non ne posseggono alcuno. Un giudizio preciso del valore pratico di un prodotto può essere dato solo dalle successive pluriennali sperimentazioni di campo.

Zusammenfassung

Die laboratoriumsmäßige Prüfung von Fungiziden erfolgt häufig mit Hilfe von Sporenkeimungstesten. Man läßt Sporen eines Pilzes auf neutraler Unterlage in Lösungen verschiedener Konzentrationen der zu prüfenden Substanz keimen und setzt deren Wirksamkeit in Beziehung zu ihrem Vermögen, die Sporenkeimung zu hemmen. Diese Methode weist im Rahmen der verschiedenen angewendeten Verfahren mehrere Schwächen auf, welche die Zuverlässigkeit der erzielten Ergebnisse in Frage stellen können. Zu diskutieren sind besonders folgende Punkte:

1. Als Testpilze werden gewöhnlich Mikroorganismen verwendet, welche sich verhältnismäßig leicht kultivieren lassen, gut sporulieren und bei denen die Sporenkeimung eindeutig erkennbar ist (z. B. *Alternaria tenuis*,

[1]) In Francia (5) ed in Germania (12) sono stati di ricente suggeriti due nuovi metodi di saggio che essenzialmente consistono, rispettivamente, nello spruzzamento di foglie contenute in scatola Petri e di giovani germogli allevati in vaso coi prodotti antiparassitari e successiva inoculazione mediante sospensioni di conidi.

Ancora non abbiamo elementi che ci permettano di giudicare il rendimento di questi sistemi. Riteniamo però che non sia sufficientemente garantita la costanza del rapporto tra antiparassitario, numero di conidi e volume dell'acqua diluente.

Macrosporium sarcinaeforme, Fusicladium dendriticum). Diese Pilze sind aber nicht immer nahe mit den in Frage stehenden Krankheitserregern verwandt und können sich physiologisch auch ganz anders verhalten, so daß besonders bei Produkten mit spezifischer Wirkung Fehlschlüsse möglich sind.

2. Durch die Verwendung neutraler Unterlagen (Glas) werden die Einwirkungen des in der Natur vorhandenen Substrates ausgeschlossen.

3. Selbst bei Beachtung größter Vorsicht ist es schwierig, das Verhältnis zwischen Fungizidkonzentration und Sporenzahl konstant zu halten. Dies gilt besonders für das (am häufigsten angewendete) Verfahren, bei dem die Konidien des Testpilzes auf zuvor mit einer Emulsion der zu prüfenden Substanz bespritzten Glasunterlage zum Keimen gebracht werden.

Wir haben nun eine Versuchsmethode ausgearbeitet, welche die angedeuteten Nachteile beseitigen oder auf ein Mindestmaß beschränken soll. Eine beliebige Menge Sporen eines pilzlichen Krankheitserregers (in unserem Falle *Plasmopara viticola*) wird in eine wässerige Suspension des zu prüfenden Fungizides gebracht und auf die Blätter der betreffenden Wirtspflanze übertragen. Dabei sollen solche Blätter gewählt werden, welche noch durch die der Giftwirkung des Fungizides entgangenen Pilzsporen infiziert werden können. Auf diese Weise wird nicht nur ein konstantes Verhältnis zwischen der Menge des Bekämpfungsmittels, der Sporenzahl und dem verdünnenden Wasservolumen, sondern auch ein gleichmäßiger Kontakt der Konidien mit dem Fungizid gesichert. Das Fungizid wird auch mindestens in der Zeit von der Zerstäubung bis zur Infektion unter den Einfluß von Verhältnissen gebracht, wie sie in der Natur vorkommen.

Von einem Fungizid bekannter Wirkung gegen *Plasmopara* stellten wir Suspensionen verschiedener Konzentrationen her, um sie als Kontrollen zu benutzen. War dieses Mittel kupferhaltig (z. B. Kupferoxychlorid), so wählten wir Konzentrationen von $^1/_{100\,000}$, $^1/_{200\,000}$ und $^1/_{400\,000}$ Kupfer, während wir bei nicht kupferhaltigen Mitteln (z. B. Zink-aethylenbis-dithiokarbamat mit 80 % Wirkstoff) Verdünnungen von $^1/_{30\,000}$, $^1/_{60\,000}$ und $^1/_{120\,000}$ des handelsmäßigen Produktes nahmen. Bei den zu prüfenden Substanzen verwendeten wir Verdünnungen von $^1/_{10\,000}$, $^1/_{30\,000}$ und $^1/_{90\,000}$.

Gleiche Mengen dieser Suspensionen wurden nun in Reagenzgläser verteilt und jedem eine ebenso große Menge Konidiensuspension von der Dichte $^{50\,000}/_1$ cm³ zugegeben. Dadurch wurden sowohl die Substanzen wie auch die Konidiensuspensionen auf die Hälfte verdünnt.

Mit Hilfe eines Glaszerstäubers spritzten wir diese Suspensionen auf Rebenblätter, welche bei 20 bis 23 ° C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre gehalten wurden. Die Versuche wurden sowohl mit abgeschnittenen Blättern oder ganzen Sprossen als auch mit Topfpflanzen durchgeführt.

Nach 24 Stunden ließen wir die Blätter abtrocknen. Die Auswertung erfolgte zwei Tage, nachdem die ersten Konidien erschienen. Verglichen wurden die Zahlen erfolgter Infektionen.

Bibliografia

In questa bibliografia sono comprese unicamente le voci a cui si fa espresso riferimento nel testo.

1. American Phytopathological Society. Commitee on Standardization of fungicidal tests (1943): The slide-germination method of evaluating protectant fungicides. Phytopathology, XXXIII, 627.
2. — — (1943): Standard laboratory bordeaux mixture. Ibidem, XXXIII, 633.
3. — — (1947): Test tube diluition technique for use with slide-germination method of evaluating protectant fungicides. Ibidem, XXXVII, 354.
4. BORZINI, G. (1940): Contributo allo studio di metodi pratici di analisi biologica e tecnica di anticrittogamici; con particolare riguardo a poltiglie da usarsi nella lotta contro la Peronospora della vite. Boll. Staz. Pat. Veg. Roma, XVIII, 254—299.
5. BREBION, G. (1955): Méthode d'évaluation directe, sur feuille isolée, de la valeur antifongique de produits ou de préparations nouveaux. Phytoma, VII, n. 71, 7.
6. CASARINI, B., e E. PUCCI (1956): Prove della efficacia fungicida di un etilenbisditiocarbammato di zinco e di un ossicloruro di rame e calcio, in vitro. Notiziario sulle malattie delle piante, N. 35—36 (N. S. 14—15), 31.
7. — —, e — — (1956): Prove preliminari di un metodo di saggio dell'efficacia comparativa di fitofarmaci acuprici su foglie. Notiziario sulle malattie delle piante, N. 35—36 (N. S. 14—15), 33.
8. — —, e — —: Prove „in vitro" della efficacia fungicida di diversi anticrittogamici su funghi scelti fra gli abituali „test" e fra alcuni dannosi parassiti delle piante. Ricerca Scientifica, in via di publicazione.
9. CIFERRI, R.: Metodi di controllo biologico degli anticrittogamici adottati in Italia. Relazione Italiana presentata alla V. éme Conference Internationale des Engrais Chimiques et Produits Chimiques utiles a l'agriculture. Zurigo 4—8, agosto 1949.
10. — —, E. BALDACCI, G. BARBENSI, L. CAVALLI, e G. GALLINA (1943): Indagini tossicometriche sugli anticrittogamici I—X. Atti Ist. Bot. R. Univ. Pavia, Labor. Critt., Serie V, I, 87—213.
11. FONTANA, P., e L. PASTORELLI (1954): Determinazione della uniformità dei depositi sui vetrini irrorati con l'apparecchiatura per la determinazione dell' attività anticrittogamica in laboratorio. Annali di Chimica, XLIV, 982.
12. LUCHETTI, G., e G. CARRARO (1956): Sull'azione di alcuni anticrittogamici „in vitro" sulla germinazione delle spore di *Fusicladium dendriticum*. Notiziario sulle malattie delle piante, n. 35—36 (N. S. 14—15), 39—48.
13. ORSENIGO, G. (1943): Un metodo di controllo biologico per gli Antiperonosporici. Rivista di Patologia Vegetale, 8 pp.
14. TESCHNER, G. (1955): Einfache Laboratoriumsteste als Beitrag zur fungiziden Mittelprüfung. Nachrichtenbl. d. Dtsch. Pflanzenschutzd., VII, 170.

Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich
Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

Kulturversuche mit einigen Arten der Gattung *Leptosphaeria* Ces. et de Not.

Von

Emil Müller und Milica Tomašević

Mit einer Abbildung

Dank der Arbeiten verschiedener Autoren wissen wir heute über die innerhalb der Ascomycetengattung *Leptosphaeria* Ces. et de Not. auftretenden Nebenfruchtformen recht gut Bescheid. Wir müssen aber immer wieder mit Überraschungen rechnen, und bei Kulturversuchen mit bisher nicht in Betracht gezogenen Arten treten oft neue, anderen Imperfektengattungen angehörende Formen auf. Auch gibt es eine größere Zahl von *Leptosphaeria*-arten, die bis heute in der Reinkultur stets steril geblieben sind. Wir sind deshalb heute noch weit davon entfernt, unsere Kenntnisse etwa für systematische Betrachtungen heranzuziehen; es sieht gegenwärtig eher danach aus, als ob keine Gesetzmäßigkeit bestünde.

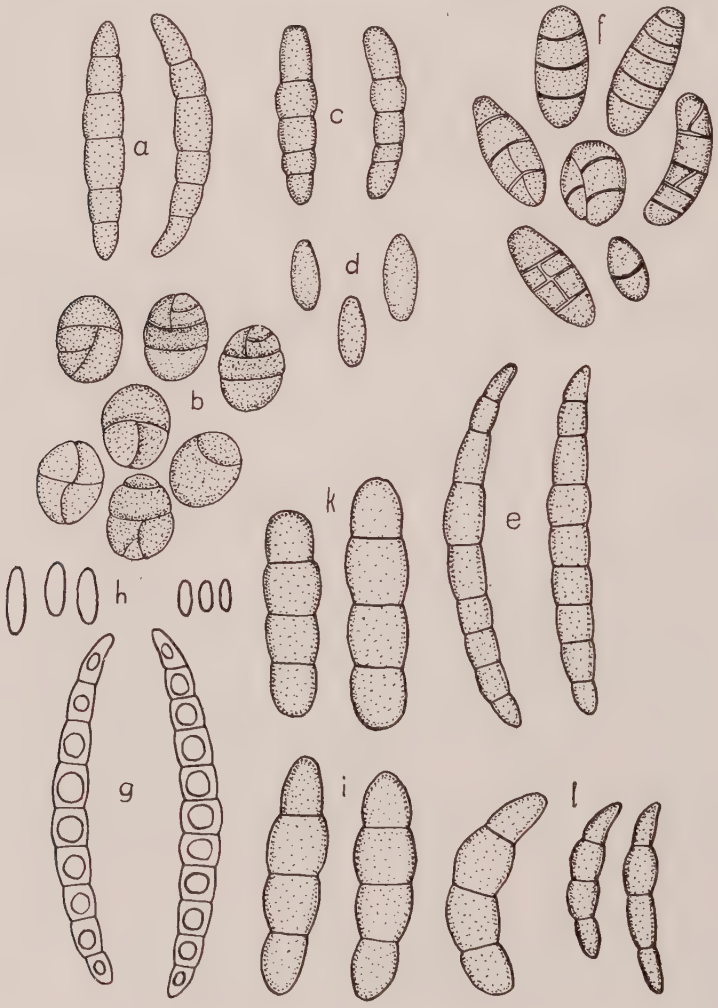
Bisher wurden Formen aus den folgenden Imperfektengattungen als Nebenfruchtformen von *Leptosphaeria*arten in Reinkultur nachgewiesen: *Hendersonia* Berk. (Webster, 1955 b), *Phaeoseptoria* Speg. (Webster, 1955 a), *Rhabdospora* Mont. (Müller, 1950, 1953), *Coniothyrium* Cda. (Brefeld, 1891; Webster, 1955 a), *Alternaria* Nees (Simmons, 1952) und *Camarosporium* Schulz (Brefeld, 1891). Außerdem wurden schon Mikrokonidienformen gefunden, welche als *Asteromella* Pass. et Thüm. oder *Phoma* Desm. bezeichnet wurden (Müller, 1950; 1953). (Die als Nebenfruchtform von *Leptosphaeria nodorum* E. Müll. erkannte *Septoria nodorum* [Berk.] Berk. ist keine typische Art der Gattung *Septoria* Fr., sondern ebenfalls eine *Hendersonia* [Müller, 1952].)

Die nachfolgend beschriebenen Versuche sollen weitere Hinweise über derartige Zusammenhänge innerhalb der in Frage stehenden Ascomycetengattung geben.

1. *Leptosphaeria polygonati* nov. spec.

Auf dürren, überwinterten Stengeln von *Polygonatum*arten findet man häufig *Leptosphaeria Bellynkii* (West.) Auersw. mit niedergedrückten Fruchtkörpern und hellgelben, vierzelligen, 20 bis 25 × 4 μ großen, spindelförmigen,

gekrümmten Sporen, welche sich durch eine deutlich verdickte zweite Zelle auszeichnen. In Alvaneubad (Kt. Graubünden, Bezirk Albula) fanden wir nun neben der reichlich auftretenden *Leptosphaeria Bellynkii* eine zweite Form mit ebenfalls vierzelligen Sporen, welche aber größer und dicker waren. Größer waren auch die Gehäuse, dabei kugelig und mit einer parenchymatisch aufgebauten Wand versehen. Um festzustellen, ob es sich bei dieser zweiten Form nicht einfach um eine Modifikation der *Leptosphaeria Bellynkii* handle, haben wir beide Formen in Kultur genommen.



Sporenformen von a) *Leptosphaeria maculans*, b) *Camarosporium*-Nebenfruchtform, c) *Leptosphaeria rusci*, d) *Coniothyrium*-Nebenfruchtform, e) *Leptosphaeria millefolii*, f) *Camarosporium*-Nebenfruchtform, g) *Leptosphaeria acuta*, h) *Leptophoma*-Nebenfruchtform, i) *Leptosphaeria polygonati*, k) *Hendersonia*-Nebenfruchtform, l) *Leptosphaeria Bellynkii*. Vergr. 1000mal

Leptosphaeria Bellynkii wächst auf Malzagar mit einem reinweißen Myzel ohne jede Spur einer Konidienform. Auch in der Natur haben wir nie irgendwelchen imperfekten Pilz angetroffen, in dem wir eine Nebenfruchtform von *Leptosphaeria Bellynkii* hätten vermuten können. Es ist daher anzunehmen, daß *Leptosphaeria Bellynkii* gar keine Nebenfruchtform besitzt. In Reinkultur entsteht aber die Hauptfruchtform.

Die zweite *Leptosphaeria*art hingegen bildet in einem gelblichen Myzelpolster reichlich Pyknidien vom Typus *Hendersonia* Berk. mit zylindrischen, vierzelligen, hellbraunen Konidien. Diese Form fanden wir auch gemischt mit der Hauptfruchtform auf dem Ausgangsmaterial in Gehäusen, welche denen der Sexualform sehr ähnlich sind. Unsere zweite *Leptosphaeria*art unterscheidet sich also nicht nur morphologisch, sondern auch in der Bildung einer Nebenfruchtform deutlich von *Leptosphaeria Bellynkii* und soll nachfolgend als neue Art beschrieben werden.

Leptosphaeria polygonati nov. spec.

Status ascophorus: Perithecia subepidermalia, globosa, 250—350 µ diam., brunnea. Ostiolum breve cylindraceum, prima clausum demum poro centrale rotundato apertum. Paries perithecii c. 40 µ crassus, cellulis polyedricis, brunneis, 20—30 µ diam. compositus. Asci cylindracei, bitunicati, 95—110 × 12—15 µ, 8-spori. Sporae late fusoideae vel cylindraceae, curvatae, prima hyalinae demum subfuscae, 24—33 × 7—8 µ, 4-cellulatae, cellula secunda crassior.

Status pycnidiophorus: Pycnidia peritheciis similia, conidiophora 3—5 µ longa et 3—5 µ crassa, hyalina. Conidia cylindracea, prima hyalina demum subfusca, 27—35 × 7,5—8,5 µ, 4-cellulata.

Hab. in caulibus emortuis Polygonati officinale L. — Helvetia, Raetia, Alvaneubad, 11. 6. 1956.

Hauptfruchtform: Die ziemlich dicht beisammenstehenden, kugeligen, der Epidermis vollständig eingesenkt wachsenden, 250 bis 350 µ großen Fruchtkörper sind dunkelbraun. Sie besitzen eine kurz zylindrisch vorstehende Mündung, welche vorerst von einem Gewebe aus dünnwandigen, hyalinen, rundlichen Zellen verschlossen ist und sich erst spät durch einen rundlichen Porus öffnet. Die Gehäusewand ist etwa 40 µ dick und besteht aus derbwandigen, dunkelbraunen, außen regelmäßig vieleckigen, nach innen schwach gestreckten, 20 bis 30 µ großen Zellen. Die Asci sind zylindrisch, an der Basis kurz knopfig gestielt, derb- und doppelwandig, 95 bis 110 × 12 bis 15 µ groß und sitzen in einem 15 bis 20 µ tiefen Basalpolster aus faserigen, zartwandigen, hyalinen bis schwach bräunlich gefärbten Zellen. Sie sind von hyalinen, fädigen Paraphysoiden umgeben und enthalten je acht Ascosporen. Diese sind breit spindelförmig bis fast zylindrisch, meist etwas gekrümmt, anfänglich hyalin, sich später bräunlich färbend, 24 bis 33 × 7 bis 8 µ groß, durch drei Querwände septiert, und sie besitzen eine deutlich verdickte zweite Zelle. Nebenfruchtform: Die Pyknidien der Nebenfruchtform sind genau gleich gebaut wie die Fruchtkörper der Hauptfruchtform. Innen stehen aber

der ganzen Wand entlang 3 bis 5 μ lange und an der Basis 3 bis 5 μ dicke, etwas konisch verlaufende hyaline Konidienträger, an denen einzeln zylindrische, vierzellige, an den Septen schwach eingeschnürte, anfänglich hyaline, sich später bräunlich färbende 27 bis 35 × 7,5 bis 8,5 μ große Konidien abgeschnürt werden.

2. *Leptosphaeria rusci* (Wallr.) Sacc.

Leptosphaeria rusci (Wallr.) Sacc. ist ein fast gemeiner Begleiter von *Ruscus*arten und stets auf deren absterbenden oder abgestorbenen Cladodien zu finden. Die Art zeichnet sich aus durch zylindrische, meist fünfzellige, bräunliche Sporen, deren zweite Zelle verdickt ist. Eine Beschreibung nebst einer Abbildung des Pilzes findet sich in MÜLLER (1950); dort werden diese Angaben noch durch eine Liste der bekannten Synonyme ergänzt.

Wir haben den Pilz von Material, welches wir bei Locarno (Kt. Tessin) gesammelt hatten, isoliert. Die Kulturen sind zunächst weiß, später werden sie lichtbraun, und schon nach wenigen Tagen beginnt die Bildung von hellwandigen Pyknidien, in denen an kurzen, breitzelligen Konidienträgern der ganzen Wand entlang einzellige, ellipsoidische bis stumpf spindelförmige, zuweilen schwach gekrümmte, 5 bis 9 × 2 bis 3 μ große, olivenbräunliche Konidien abgeschnürt werden.

Wir stellten diese Form auch auf den als Ausgangsmaterial für die Reinkultur dienenden *Ruscus*cladodien fest und haben sie als Form der Gattung *Coniothyrium* Cda. emend Petr. et Syd. (vgl. PETRAK und SYDOW, 1927) identifiziert. Merkwürdigerweise scheint dieser Pilz bis heute wenig Beachtung gefunden zu haben. Möglicherweise ist er auch mit der ebenfalls auf *Ruscus* vorkommenden *Phyllostictina hypoglossi* (Mont.) Petr. et Syd. verwechselt worden. Von dieser unterscheidet sich unser Pilz aber deutlich durch die braunen, deutlich begrenzten Konidien, welche bei *Phyllostictina* hyalin und mit schleimig zerfließender Hülle versehen sind. Immerhin scheint der Pilz doch schon mehr als einmal beschrieben worden zu sein. Wir fanden ein *Coniothyrium hypoglossi* Mutto und eine *Haplosporella ruscigena* Bub., welche nach der Beschreibung mit unserem Pilz übereinstimmen. Vermutlich gehört aber auch der von PETRAK und SYDOW (1927) zu *Phyllostictina hypoglossi* gestellte, als *Sphaeropsis rusci* Thüm. beschriebene Pilz hierher, so daß sich folgende Zusammenhänge ergeben:

***Leptosphaeria rusci* (Wallr.) Sacc.**

Synonyme: vgl. MÜLLER, 1950, p. 253.

Matrix: auf dürren Cladodien von *Ruscus aculeatus* L. und *Ruscus hypoglossum* L. (südliches Europa).

Nebenfruchtform: *Coniothyrium*,
beschrieben als:
Coniothyrium hypoglossi Mutto — Atti Ist. Bot. Pavia **16**, 207 (1916),
Haplosporella ruscigena Bub. — Bull. Herb. Boiss. 2 sér. **6**, 481 (1906),
? *Sphaeropsis rusci* Thüm. — Hedwigia **21**, 23 (1882).

Dieses Resultat ist nicht neu. BREFELD (1891) hat bei der Kultur von *Leptosphaeria rusci* ebenfalls Pyknidien mit gelbbraunen, 9 bis 13 × 3 bis 4 μ

großen Konidien erhalten, welche er als *Phyllosticta ruscigena* (Dur. et Mont.) bezeichnete. Diese Art ist aber von Petrak und Sydow (1927) zu *Phyllostictina hypoglossi* gestellt worden, kann also nicht mit dem *Conithyrium* identisch sein.

3. *Leptosphaeria acuta* (Moug. et Nestl.) Karst.

Auf dürren Stengeln von *Urtica*arten trifft man häufig auf *Leptosphaeria acuta* (Moug. et Nestl.) Karst., vergesellschaftet mit *Phoma acuta* (Fr.) Fuck. Auch mit *Leptosphaeria acuta* hat Brefeld (1891) Kulturversuche angestellt, dabei aber nur ein steriles Myzel ohne Spur einer Fruktifikation erhalten. Trotzdem haben seither verschiedene Autoren die von Karsten (1873) als Spermogonienform zu diesem Pilz gestellte *Phoma acuta* (Fr.) Fuck. als Nebenfruchtform betrachtet, zuletzt von Höhnel (1915). Auf Grund der von anderen Arten der Formgattung abweichenden Morphologie hat dieser Autor für *Phoma acuta* die neue Gattung *Leptophoma* aufgestellt und sie ausdrücklich als in den Entwicklungszyklus von *Leptosphaeria acuta* gehörende Nebenfruchtform bezeichnet. Andere Autoren haben aber die Sicherheit dieses Zusammenhanges bezweifelt, was auf Grund des negativen Resultates von Brefeld durchaus berechtigt war. Dank unserem Kulturversuch mit *Leptosphaeria acuta* ist es uns nun doch gelungen, den vermuteten Zusammenhang sicherzustellen:

Leptosphaeria acuta (Moug. et Nestl.) Karst.

Synonyme: vgl. Müller, 1950, p. 301.
Matrix: dürre Stengel von *Urtica*-Arten.
Nebenfruchtform: *Leptophoma*,
beschrieben als:
Sphaeria acuta Fr. — Syst. Myc. **2**, 507 (1823) (per parte teste v. Höhnel, 1915),
Phoma acuta Fuck. — Symb. Myc. 125 (1869),
Leptophoma acuta v. Höhn. — Sitzber. K. Ak. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl. **124**[1], 73 (1915).

4. *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces et de Not.

Leptosphaeria maculans (Desm.) Ces. et de Not. ist ein Pilz, welcher auf Phanerogamen verschiedenster Familien saprophytisch wächst und dabei, was die Größe von Fruchtkörpern, Asci und Sporen anbelangt, ziemlich variabel ist. Hingegen stimmen die verschiedenen Herkünfte sehr gut in der Form der Sporen überein, und auch der Bau der Fruchtkörper ist bei allen uns zugänglichen Materialien sehr gleichartig. Trotzdem haben wir bei sämtlichen uns zur Verfügung stehenden Herkünften aus unserem Herbar Sporenmessungen durchgeführt, um festzustellen, ob nicht doch mehr als eine Art unterschieden werden müsse. Es hat sich dabei gezeigt, daß sich dies nicht durchführen läßt; die Differenzen lassen keine Gesetzmäßigkeit erkennen, und die Überschneidungen sind derart häufig, daß eine Trennung unmöglich wäre. Die von Müller (1950) gegebene Synonymieliste besteht demnach zu Recht.

Ein Kulturversuch mit *Leptosphaeria maculans* wurde schon früher beschrieben (Müller, 1953). Der Autor erhielt in Reinkultur einen Pyknidienpilz, der auf Grund seiner 3 bis 5 × 2 bis 3 μ großen ellipsoidischen, hyalinen

Konidien als *Phoma* Fr. bezeichnet wurde, ohne daß er es aber unternommen hätte, die Form einer beschriebenen Art dieser Gattung zuzuordnen. TULASNE (1863) erwähnt bei *Leptosphaeria maculans* (bei ihm als *Pleospora maculans* bezeichnet) als Pyknidienform *Sphaeria Lingam* Tode (*Phoma Lingam* [Tode] Desm.), die wir auch zu *Leptophoma* v. H. stellen. Im vergangenen Sommer haben wir nun wiederum eine *Leptosphaeria* isoliert, welche wir eindeutig *Leptosphaeria maculans* zuweisen können und welche auf abgestorbenen Stengeln von *Artemisia campestris* L. neben *Ophiobolus compressus* Rehm in Jouques (Südfrankreich, Dept. Var) am 19. Juni 1956 gesammelt worden ist. Auf Malzagar breiten sich die Kulturen rasch mit einem weißen Myzel aus, und nach einigen Tagen beginnt die Bildung von Pyknidien. In den einen Fruchtkörpern, welche allerdings nur spärlich vertreten sind, werden Konidien gebildet, die mit den früher beschriebenen und zu *Phoma* gestellten gut übereinstimmen. Häufiger werden aber Pyknidien mit *Camarosporium*konidien beobachtet. Beide Formen kommen auch gemischt auf dem als Ausgangsmaterial für die Kultur verwendeten Substrat vor.

Die Pyknidien des *Camarosporium* sind kugelig, 240 bis 430 μ groß, braun und mit einer papillenförmigen Mündung versehen. Die Wand besteht aus polyedrischen, nicht sehr derbwandigen, nur außen deutlich braunen, gegen innen subhyalinen, 9 bis 16 μ großen Zellen, welche sich gegen das Innere langsam auflösen. Der gesamte Hohlraum ist mit kugeligen oder ellipsoidischen, 12 bis 20 $\times$ 9 bis 12 μ großen, durch Quer- und Längswände mehrzelligen, braunen Konidien erfüllt. Konidienträger sind keine vorhanden, hingegen läßt sich an jungen Fruchtkörpern die Entstehung der Konidien beobachten. Das ganze Fruchtkörperinnere ist anfänglich von einem Gewebe aus regelmäßig vieleckigen, zartwandigen, hyalinen Zellen ausgefüllt. Vom Zentrum her nach außen fortschreitend bilden sich nun in diesen Zellen die anfänglich einzelligen, hyalinen, sich später in mehrere Zellen teilenden und braun färbenden Sporen, wobei die Sporenmutterzellen nach und nach aufgelöst werden und die jungen Konidien den ganzen Fruchtkörperinnenraum anfüllen.

Wir haben versucht, diese *Camarosporium*art mit einer beschriebenen Form zu identifizieren. Durch Vergleich mit Herbarmaterial kommen wir zum Schluß, daß es sich um *Camarosporium affine* Sacc. Bomm. et Rouss. handeln muß.

Leptosphaeria maculans bestätigt die Erfahrung, daß innerhalb einer Art nicht alle Stämme auch sämtliche möglichen Nebenfruchtformen ausbilden: Im Stamm von *Isatis tinctoria* L. (MÜLLER, 1953) wird nur die Mikrokonidienform zur Ausbildung gebracht, während im Stamm von *Artemisia campestris* L. sowohl die Mikrokonidienform als auch die Makrokonidienform entstehen können. Die Verhältnisse lassen sich folgendermaßen darstellen:

***Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.**

Synonyme: vgl. MÜLLER, 1950, p. 244.

Matrix: auf abgestorbenen Kräutern verschiedenster Familien, wie Cruciferen, Oenotheraceen, Gentianaceen, Compositen.

Nebenfruchtform: Makrokonidienform: *Camarosporium*,
beschrieben als:
Camarosporium affine Sacc. Bomm. et Rouss. — Fl. Myc. Belge **2**, 38 (1887);
Mikrokonidienform: *Leptophoma*,
beschrieben als:
Sphaeria Lingam Tode — Fungi Mecklenb. **2**, fig. 116 (1791),
Phoma Lingam Desm. — Ann. Sc. Nat. 3 sér. **11**, 281 (1849).

5. *Leptosphaeria millefolii* (Fuck.) Niessl.

Auch *Leptosphaeria millefolii* (Fuck.) Niessl ist schon von Brefeld (1891) in Kultur beobachtet worden. Dieser Autor konnte zwar die Anfangsstadien der Pyknidienbildung verfolgen, diese wurden aber in der Folge nicht mehr weiter entwickelt. Reife Konidien hat er nie erhalten.

Wir haben *Leptosphaeria millefolii* ebenfalls isoliert, und zwar aus Material von *Achillea nobilis* L., das wir am 22. Juni 1955 in Tende (Südfrankreich, Alpes-Maritimes) gesammelt hatten. In der Kultur werden — übereinstimmend mit *Leptosphaeria maculans* — eine Mikrokonidienform mit länglich ellipsoidischen, 4 bis 5 × 2 μ großen, hyalinen Konidien und eine Makrokonidienform mit Sporen vom *Camarosporium*typ gebildet. Beide Formen treten ebenfalls gemischt mit der Hauptfruchtform auf dem Ausgangsmaterial auf. Die Pyknidien der Makrokonidienform sind 180 bis 300 μ groß, kugelig oder senkrecht ellipsoidisch und besitzen eine parenchymatisch aufgebaute Wand aus polyedrischen, 10 bis 14 μ großen, nicht sehr derbwandigen, braunen Zellen. Wie bei *Leptosphaeria maculans* fehlen Konidienträger vollständig. Die Konidien sind ellipsoidisch oder ganz selten auch kugelig, 9 bis 18 × 5 bis 7 μ groß und durch Quer- und Längssepten mehrzellig. Gegenüber den Makrokonidien von *Leptosphaeria maculans* sind sie heller, mehr längsgestreckt und würden am besten mit der als *Camarosporium aequivocum* (Pass.) Sacc. beschriebenen Form übereinstimmen.

Leider lassen sich die *Camarosporium*arten morphologisch kaum fassen, da die Variabilität der Sporenformen und -größen, der Ausbildung von Septen und der Farbe schon innerhalb eines homogenen Materials (zum Beispiel einer Reinkultur) sehr groß ist. So hat schon Brefeld (1891) seine aus der Kultur von *Leptosphaeria caespitosa* (Niessl) erhaltene Form *Camarosporium aequivocum* zugeteilt. Wir möchten deshalb darauf verzichten, das in der Kultur von *Leptosphaeria millefolii* beobachtete *Camarosporium* mit einer beschriebenen Art zu identifizieren. Ebensowenig sind wir in der Lage, die Mikrokonidienform einer beschriebenen Art zuzuordnen; sie muß aber auch als *Leptophoma* betrachtet werden.

Für *Leptosphaeria millefolii* ergeben sich demnach folgende Verhältnisse:

***Leptosphaeria millefolii* (Fuck.) Niessl.**

Synonyme: vgl. Müller, 1950, p. 296.
Matrix: auf *Achillea*-Arten.
Nebenfruchtform: Makrokonidienform: *Camarosporium*,
Mikrokonidienform: *Leptophoma*.

Zusammenfassung

Wir haben bei fünf verschiedenen Arten der Ascomycetengattung *Leptosphaeria* Ces. et de Not. Kulturversuche angestellt und in allen Fällen Nebenfruchtformen erhalten, die wir auch auf dem Ausgangsmaterial für die Kulturen beobachten konnten. Es ergeben sich daraus folgende Zusammenhänge zwischen Ascomyceten und Fungi imperfekti:

*Leptosphaeria*art	Makrokonidienform	Mikrokonidienform
acuta	—	*Leptophoma*
maculans	*Camarosporium*	*Leptophoma*
millefolii	*Camarosporium*	*Leptophoma*
polygonati	*Hendersonia*	—
rusci	*Coniothyrium*	—

Literaturverzeichnis

Brefeld, O., und F. v. Tavel (1891): Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie **10**, Münster i. Westfalen.

v. Höhnel, F. (1915): Sitzungsber. K. Akad. Wissensch. Wien, math.-naturw. Kl., **124**[1], 73.

Müller, E. (1950): Sydowia **4**, 185—319.

— — (1952): Phytopath. Z. **19**, 403—416.

— — (1953): Sydowia **7**, 325—334.

Petrak, F., und H. Sydow (1927): Rep. Spec. Nov. Regni Vegetabilis Beihefte, **42**.

Simmons, E. G. (1952): Mycologia **44**, 330—365.

Tulasne, L., und C. Tulasne (1863): Selecta Fungorum Carpologia **2**, Paris.

Webster, J. (1955 a): Transaction British Mycological Soc. **38**, 347—365.

— — (1955 b): l. c. **38**, 405—408.

Aus dem Botanischen Institut der Naturwissenschaftlichen Fakultät Zagreb

Über Sklerotienbildung bei *Pyronema domesticum* (Sow.) Sacc.

Von

M. Tunkl und Z. Devidé

Mit einer Abbildung

1. Vorbemerkungen

Für eine Diplomarbeit (Tunkl, 1955) unter der Leitung von Prof. Dr. S. Horvatić hätten die zytologischen Verhältnisse im Fortpflanzungsmechanismus bei *Pyronema domesticum* (Sow.) Sacc. eingehender untersucht werden sollen (Zusammenfassung z. B. Gäumann, 1949). Leider führten diese Arbeiten infolge methodischer Schwierigkeiten zu keinen gesicherten neuen Ergebnissen. Hingegen gewannen wir vermehrte Erfahrungen über die Kultur dieses Pilzes, und vor allem beobachteten wir auch das Auftreten von Sklerotien, was nun nachträglich durch weitere Versuche genauer geklärt wurde. Da in der uns zur Verfügung stehenden Literatur keine Angaben über Sklerotienbildung bei *Pyronema* bzw. *Pyronemaceae* zu finden sind, soll hier darüber berichtet werden.

2. Material und Kulturbedingungen

Der Ascomycet *Pyronema domesticum* tritt im Botanischen Institut Zagreb unregelmäßig, manchmal erst wieder nach Jahren, an einer feuchten Mauerstelle auf. Morphologisch stimmen seine Fruchtkörper und seine Fruchtschicht mit den Angaben in der Literatur überein. Im Jahre 1952 wurde er isoliert und zunächst nach der von Claussen (1912) angegebenen Methode kultiviert. Dieser Autor verwendete zwei Agarnährböden, von denen der eine Inulin enthielt, der andere nicht. Der inulinhaltige Nährboden befindet sich in einem flachen Behälter im Zentrum des inulinlosen Nährbodens. Die Sporen werden nun auf den inulinhaltigen Nährboden ausgesät und wachsen hier zu einem üppigen Myzel aus; auf dem inulinlosen Substrat, meist am Rande des Gefäßes, werden dann die Apothecien gebildet. Da die uns zur Verfügung stehende Menge Inulin für die beabsichtigten Versuche nicht ausreichte, versuchten wir das chemisch reine Inulin durch Georginenknollenextrakt zu ersetzen (Georginen = *Dahlia variabilis* Desf.). Hierbei zeigte es

sich, daß *Pyronema domesticum* auf dem mit Georginenknollenextrakt zubereiteten Agar bedeutend üppiger gedeiht als auf dem Inulin-Agar, und daß es außerdem auf diesem Substrat in der Regel auch gut fruktifiziert. Georginenknollenextrakt läßt sich sehr einfach herstellen, ermöglicht ein üppiges Wachstum und veranlaßt den Pilz zur Fruchtkörperausbildung; wir haben deshalb diesen Nährboden der komplizierteren CLAUSSENschen Methode vorgezogen.

Das Georginenknollenextrakt wird folgendermaßen zubereitet: Gereinigte und geschälte Knollen werden fein zerhackt oder mit der Fleischhackmaschine zermahlen und in der Reibschale zerrieben. Mit destilliertem Wasser wird die Masse zu einem dünnen Brei verarbeitet, welcher noch unter Zugabe von Glaskügelchen in der Schüttelmaschine während einer Stunde homogenisiert wird. Darauf sieben wir die gewonnene breiige Masse durch ein engmaschiges Tuch und lassen das Destillat in flachen Schalen im Thermostat trocknen. Der fein pulverisierte und durchgesiebte Rückstand kann in gut schließenden Gefäßen trocken aufbewahrt werden. Wir verwendeten Georginenextrakt in gleichen Mengen wie chemisch reines Inulin (2 %). Nachteilig ist einzig die Trübung des Nährmediums, was sich aber durch Filtrieren vor der Agarzugabe weitgehend beheben läßt.

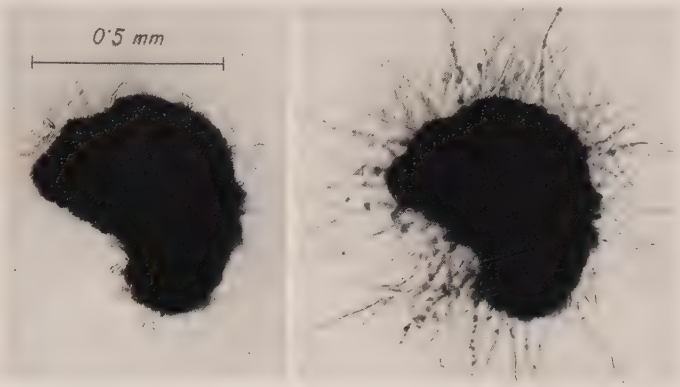
3. Sklerotienbildung

Schon in den nach CLAUSSEN (1912) zubereiteten Nährböden in den ersten Überimpfungen des Pilzes beobachteten wir das Auftreten zahlreicher schwarzer Körnchen, die kleiner als Mohnsamen waren. Unter dem Mikroskop stellten wir undurchsichtige Körperchen von unregelmäßiger Gestalt fest, aus denen strahlenartig Hyphen hervorwuchsen. Mit Haematoxylin gefärbte Paraffinschnitte zeigten einen pseudoparenchymatischen Bau, ohne Differenzierung in eine pseudoparenchymatische Kruste und ein prosenchymatisch aufgebautes Mark, wie bei *Claviceps* festgestellt werden konnte. Die mikrochemische Reaktion auf Chitin war stets positiv. Es mußte sich also um Sklerotien handeln.

Tatsächlich gelang es auch, den Pilz mit Hilfe derartiger Körperchen leicht auf frische Nährböden zu übertragen, während eine Übertragung mit Myzelstücken oder Hyphen durch die Öse stets mißlang (Erfolg hatten wir in diesen Fällen nur mit ganzen Agarstücken). Die Aussaat von Sklerotien war noch erfolgreich, wenn sie drei Jahre lang in mit Paraffin verschlossenen Probierröhrchen mit Agar aufbewahrt worden waren.

Um die Möglichkeit einer Keimung durch anhaftende Hyphen auszuschließen, wurden die Sklerotien mit Hilfe feiner Nadeln unter der Binokularlupe isoliert und mit feinem Filtrierpapier abgerieben. Dann wurden sie mit steriler Nährlösung gewaschen (CLAUSSENsche Nährlösung ohne Agar) und unter dem Mikroskop untersucht. Sklerotien, bei denen die Reinigung völlig gelungen war, wurden nun mit Filtrierpapier abgetrocknet und in kleinen Proberöhrchen trocken aufbewahrt. Nach beliebiger Zeit (einige Tage bis fünf Monate) brachten wir die Sklerotien in frische Nährlösung und beobachteten ihr Verhalten im hängenden Tropfen unter dem Mikroskop. Die Keimung erfolgte nach einigen (meist drei bis vier) Stunden. Diese Zeit war vermutlich für die Aufnahme der Nährlösung notwendig.

Das Wachstum der Hyphen erfolgte rasch. Die Abb. zeigt zwei Entwicklungsstadien einer in dieser Weise beobachteten Deckglaskultur. Diese Versuche beweisen eindeutig, daß die in Frage kommenden Gebilde von *Pyronema domesticum* nicht nur nach ihrem anatomischen Bau, sondern auch nach ihrer Funktion zweifellos echten Sklerotien, also Dauermyzelien, entsprechen.



Sklerotium von *Pyronema domesticum* in Deckglaskultur. Die Kultur wurde um 11.30 Uhr angelegt. Die ersten Hyphen konnten um 14.40 Uhr beobachtet werden. Links: um 15.30 Uhr. Rechts: um 17.00 Uhr

Die Bildung von Sklerotien bei *Pyronema domesticum* kommt — nach unseren Erfahrungen — nur bei Anwesenheit von Inulin und bei Lichtmangel zustande. Nur bei eintrocknenden, inulinhaltigen Nährböden kann auch bei schwacher Lichteinwirkung noch Sklerotienbildung beobachtet werden. Sklerotienbildung und die Bildung von Apothecien schließen sich demnach gegenseitig aus; während die erstere nur unter Lichtabschluß und Anwesenheit von Inulin möglich ist, verlangt die Bildung von Apothecien mit reifen Sporen inulinlose Nährböden, dafür aber Lichteinwirkung.

Die Sklerotienbildung beginnt einige Tage nach der Sporenaussaat. Das Myzel verdichtet sich stellenweise zu dichten, wolligen Knäueln, wobei die Hyphen kleine, aber mikroskopisch sichtbare, weiße Körperchen bilden und sich immer mehr in ein dichtes Geflecht umwandeln, was als partielle Transformation des Myzels (Langeron, 1945) gedeutet werden kann. Später werden die Sklerotien zunächst braun und dann schwarz und ihre Entwicklung ist nach acht bis zehn Tagen abgeschlossen.

Sklerotienbildung wurde auch an weiteren Stämmen von *Pyronema domesticum* beobachtet. Der erste Verfasser hatte, dank dem freundlichen Entgegenkommen des „British Museum“ und des „Centraalbureau voor Schimmelcultures“ in Baarn (Holland), Gelegenheit, in Exsiccaten von *Pyronema domesticum* und Kulturen von *Pyronema confluens* Tul. Einsicht zu nehmen. In beiden Fällen konnten Sklerotien festgestellt werden.

Dank der Sklerotien läßt sich *Pyronema* bequem in Form von Dauerkulturen aufbewahren.

Zusammenfassung

Pyronema domesticum wurde nach der von Claussen (1912) angegebenen Methode kultiviert. Indem das chemisch reine Inulin durch Extrakt aus Georginenknollen (*Dahlia variabilis* Desf.) ersetzt wurde, konnte diese Methode vereinfacht und verbessert werden. In den Kulturversuchen mit dem von uns isolierten Stamm wurde das Auftreten von Sklerotien beobachtet. Es handelt sich dabei um kleine, wenige Zehntel Millimeter messende Gebilde von unregelmäßiger Gestalt und pseudoparenchymatischem Bau, deren Funktion als Dauermyzelien nachgewiesen werden konnte. Ihre Bildung ist an inulinhaltige Nährböden gebunden, welche unter Lichtmangel gehalten werden. Bei feuchter Aufbewahrung (auf Agar) bleiben sie mindestens drei Jahre, bei trockener Aufbewahrung mindestens fünf Monate keimfähig. Dadurch wird eine Dauerkultur ermöglicht. Sklerotienbildung wurde auch an anderen Stämmen von (*Pyronema confluens* und) *Pyronema domesticum* festgestellt.

Literaturverzeichnis

Claussen, P. (1912): Zur Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten: *Pyronema confluens*. Z. Botanik **4**, 1—63.

Gäumann, E.: Die Pilze (p. 194—195). Basel 1949.

Langeron, M.: Précis de mycologie (p. 51—56). Paris 1945.

Tunkl, M. (1955): Prilog poznavanju vrste *Pyronema domesticum* (Sow.) Sacc. [Beitrag zur Kenntnis von *Pyronema domesticum* (Sow.) Sacc.]. Botanisches Institut der Naturwissenschaftlichen Fakultät Zagreb. (Nicht publiziert.)

Aus der Eidgenössischen Anstalt für das forstliche Versuchswesen, Zürich
Direktor: Prof. Dr. A. Kurth

Tannin- und phenolspaltende Fermente dreier parasitischer Pilze

Von
G. Bazzigher

Mit 2 Abbildungen

Inhalt: 1. Einleitung. — 2. Methodik. — 3. Esterase und Pyrogallase. — 4. Aktivitätsprüfung in Verdünnungsreihe. — 5. Die Bildung der Fermente in vitro in Abhängigkeit von der Kulturdauer. — 6. Der Nachweis der Fermente in vivo. — 7. Fermentinhibitoren und Fermentsubstrate. — 8. Die Trennung der Fermente durch Papierelektrophorese und der Nachweis dieser Trennung durch Papierchromatographie. — 9. Schlußfolgerung. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit ist eine Weiterführung und Ergänzung der früheren Publikation (Bazzigher, 1955), in der die Spaltung von Tanninen in vitro und in vivo durch das Wirken einer Esterase und einer Laccase beim Erreger des epidemischen Kastaniensterbens nachgewiesen wurde. Es wurde dort auch darauf hingewiesen, daß noch weitere Fermente mitwirken müssen. Insbesondere war eine starke Enzymwirkung auf Gallussäure beobachtet worden, die noch nicht näher erklärt werden konnte. Die vorliegende Arbeit soll nun zeigen, daß verschiedene Pilze ähnlich wie *Endothia* Tannine in vitro und in vivo abbauen. Die enzymatische Spaltung von Gallussäure dürfte einer bei allen drei untersuchten Pilzen vorkommenden Pyrogallase zuzuschreiben sein. Dieses Enzym ist noch sehr wenig untersucht.

Herrn Prof. Dr. E. Gäumann möchte ich für die uns zur Verfügung gestellten Materialien, Laboreinrichtungen und Versuchsräume meinen besten Dank aussprechen. Fräulein Jäggli danke ich für ihre Mithilfe ebenfalls recht herzlich.

2. Methodik

Versuchsmaterial: *Endothia parasitica* (Murr.) And.: Kultur auf KYG (siehe Bazzigher, 1955) + 3 ‰ Gallussäure bei 27 ° C; Kulturdauer: drei Wochen bis drei Monate.

Herpotrichia nigra Hart.: Kultur auf KYG + 3 ‰ Gallussäure bei 18 ° C; Kulturdauer: ein bis drei Monate.

Trametes radiciperda Hart.: Kultur auf KYG + 3 ‰ Gallussäure bei 24 ° C; Kulturdauer: ein bis drei Monate.

Herstellung des Enzympräparates: Versuche haben uns gezeigt, daß die in unseren Untersuchungen verwendeten Enzyme bei relativ hohen Temperaturen wirken, und daß im thermischen Wirkungsbereich von etwa 0 bis 70 ° C das mutmaßliche Optimum sich bei 45 ° C befinden dürfte. Dies bedeutet für unsere Arbeiten eine Vereinfachung der Herstellung der Enzympräparate. Im Turmix zerkleinerte Kulturen können ohne weitere Behandlung (z. B. mit Aceton) direkt als Enzympräparat verwendet werden, da die Inkubationstemperatur die Pilze abtötet und nur die Fermente wirken können. Damit haben wir für unsere Versuche eine schonende und sichere Methode.

Enzymsubstrate: Tannin, Gallussäure, Gallussäure-n-propylester, Pyrogallol und Hydrochinon in Konzentrationen von 1 bis 3 g/L.

Papierchromatographie: Papier: Whatman Nr. 1; Lösungsmittelgemisch 313 (SCHMIDT, 1952); Reagens: ammon. Silbernitratlösung.

Papierelektrophorese: Papier: Whatman Nr. 3 MM; Pufferlösung: Phosphatpuffer nach SOERENSEN (KLEIN, 1932) pH 5,8 (nähere Angaben siehe Text).

3. Esterase und Pyrogallase

Bei allen drei untersuchten Pilzen konnten tannin- und phenolspaltende Enzyme festgestellt werden. Das tanninspaltende Ferment, das in der Wirkung der Tannase sehr ähnlich ist, wurde früher auf Grund der Angaben von FOSTER (1949) (siehe BAZZIGHER, 1955) als eine Esterase identifiziert. Eine Trennung von Tannase und Esterase durch Chromatographie (TOTH and BARSONY, 1943) ergab nun ein, dieser früheren Bestimmung widersprechendes Ergebnis. Esterase wird in einer Aluminiumoxydsäule zurückgehalten, Tannase hingegen nicht. Unsere Versuche zeigten aber, daß die tanninspaltenden Fermente der drei untersuchten Pilze die Aluminiumsäule passieren, und demzufolge müßte es sich um eine Tannase handeln. Es ist also vorderhand unmöglich, das Ferment zu identifizieren, und wir möchten die Bezeichnung Esterase beibehalten insbesondere, da uns im Rahmen dieser Arbeit vom phytopathologischen Standpunkt aus vorläufig nur die Wirkung des Fermentes interessiert.

Auf den Abbau von Gallussäure wurde früher schon hingewiesen. Spärliche Angaben von NICHOLSON (1931) existieren über ein gallussäure- und pyrogallol-spaltendes Enzym, das Pyrogallase genannt wird. Die Eigenschaften dieses Fermentes stimmen mit dem unseren überein, so daß wir annehmen können, daß es sich um dasselbe handelt.

4. Aktivitätsprüfung in Verdünnungsreihe

Pilzkulturen werden im Turmix zerkleinert (siehe Methodik) und im Faltenfilter filtriert. Vom Filtrat wird eine Verdünnungsreihe hergestellt: 1, 1/2, 1/4, 1/8 usw. (Verdünnungen in zehn Verdünnungsstufen). Zu je 1 ml dieser

verschieden konzentrierten Lösungen wird je 1 ml Fermentsubstrat hinzugefügt und hernach bei 45 ° C während sechs Tagen inkubiert. Zur Verhinderung einer zu starken Verdunstung hält man die Lösungen während dieser Zeit in Reagenzgläsern, die mit einer Stanniolfolie zugedeckt sind. Fermentsubstrat: Gallussäure-n-propylester-Lösung (2 g/L). Anschließend wird im Papierchromatogramm geprüft, wobei möglichst quantitativ gearbeitet werden soll. Der reziproke Wert der kleinsten Fermentkonzentration, die für den vollständigen Abbau des Esters (also 2 mg) bzw. der abgespaltenen Gallussäure während der sechstägigen Inkubationsdauer genügt, entspricht den Aktivitätseinheiten des geprüften Kulturfiltrates. Diese lange Inkubationsdauer von fast einer Woche mußte deshalb gewählt werden, weil durch die relativ niedrige Pyrogallasekonzentration die Wirkung (gegenüber der Esterase) stark verlangsamt ist. Tabelle 1 zeigt an einem Beispiel die durchschnittlichen Einheiten, welche an verschiedenen Proben der drei untersuchten Pilzkulturen (überall etwa zwei Monate alte Kulturen) ermittelt wurden.

Tabelle 1

Aktivitätseinheiten von Kulturen verschiedener Pilze

Ferment	*Endothia parasitica*	*Herpotrichia nigra*	*Trametes radiciperda*
Esterase	30	12	32
Pyrogallase	3	8	2

Auffallend ist die starke Pyrogallaseaktivität bei *Herpotrichia nigra* bei einer relativ niedrigen Esteraseaktivität. Die Aktivität von Fermentpräparaten aus Myzel stimmt meistens nicht mit derjenigen aus Kulurfiltrat überein. Es scheint, daß die Esterase mehr im Myzel, die Pyrogallase mehr in der Kulturlösung zu finden ist.

5. Die Bildung der Fermente in vitro in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Endothia-Kulturen verschiedenen Alters (drei Wochen bis acht Monate) wurden auf ihre Fermentaktivität hin geprüft. Es wurde kein wesentlicher Unterschied weder in der Esterase- noch in der Pyrogallaseaktivität bei diesen verschieden alten Kulturen festgestellt. Bei *Trametes radiciperda* und *Herpotrichia nigra* scheinen die Verhältnisse ähnlich zu sein. Die Bildung der Fermente geht demzufolge dem Myzelwachstum parallel und ist beim Erreichen des Wachstumsmaximums im wesentlichen abgeschlossen.

6. Der Nachweis der Fermente in vivo

Endothia-Fermente in erkranktem Kastaniengewebe wurden früher schon nachgewiesen (Bazzigher, 1955). Es gelang uns in weiteren Versuchen, die Wirkung der *Herpotrichia nigra*-Fermente an befallenen *Pinus*zweigen zu zeigen, und wir haben ferner deutliche Anhaltspunkte dafür, daß Ähnliches auch für *Trametes radiciperda* an Fichte gilt. Überall ist eine vollständige Spaltung der Tannine und der phenolischen Spaltprodukte auffällig.

7. Fermentinhibitoren und Fermentsubstrate

Gallussäure wird in bedeutend stärkerem Maße durch die Pyrogallase gespalten, wenn sie als frisches Produkt der Gallussäureester-Spaltung (durch Esterase) auftritt, als wenn sie fertig zugegeben wird. Ein weiteres Pyrogallasesubstrat ist Pyrogallol, dessen Abbau in unserer früheren Arbeit einer Laccase zugeschrieben wurde. Heute scheint es uns wahrscheinlicher, daß die Pyrogallase für die Spaltung verantwortlich ist, um so mehr, als in unseren früheren Versuchen die üblichen Laccaseinhibitoren völlig unwirksam waren. Hydrochinon wird ebenfalls fermentativ abgebaut, und wie wir später sehen werden, ist dies wohl ebenfalls der Pyrogallase zuzuschreiben. Hydrochinon wirkt jedoch anderseits als Pyrogallaseinhibitor, indem sie den Gallussäureabbau verlangsamt. Ein weiterer Hemmstoff ist Glukose in einer Konzentration von 10 %. 5 % Glukose hat keine hemmende Wirkung, sondern wirkt eher etwas beschleunigend. Diese Versuchsergebnisse stimmen mit den Angaben von FOSTER (1949) überein (Schutzwirkung von 10 % Glukose gegen den Abbau von Gallussäure, die in *Penicillium*-Kulturen durch Spaltung von Tanninen frei wurde). Diese untersuchten Fermentinhibitoren wirken eigentlich nur bedeutend verlangsamend. Die Wirkung wird in allen Fällen nach relativ kurzer Zeit aufgehoben. Andere Hemmstoffe konnten bis heute nicht ermittelt werden. Esterase-Inhibitoren konnten wir überhaupt keine finden. Es sind also beides ziemlich stabile Fermente, die einzig durch Kochen zerstört werden.

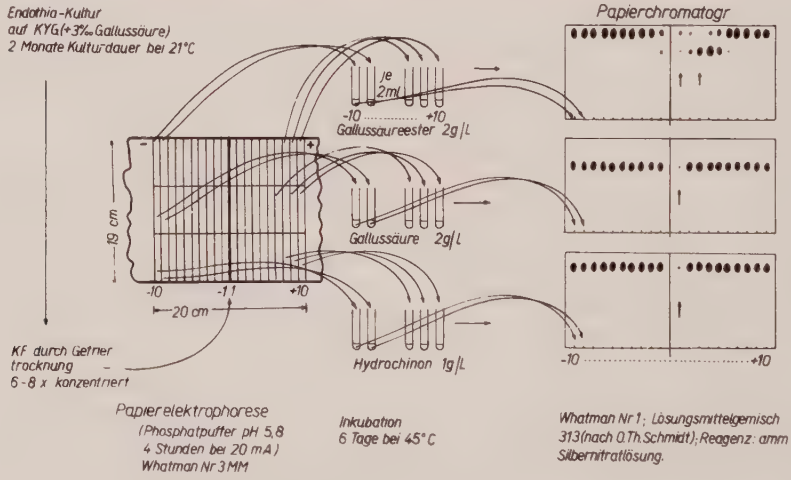


Abb. 1. Schematische Darstellung der papierelektrophoretischen Trennung der Pyrogallase und Esterase und der Nachweis dieser Trennung im Papierchromatogramm

8. Die Trennung der Fermente durch Papierelektrophorese und der Nachweis dieser Trennung durch Papierchromatographie

Pilzkulturen werden im Turmix zerkleinert und im Faltenfilter filtriert. Durch Gefriertrocknung wird das Filtrat konzentriert (dies je nach der Aktivität). Das Konzentrat wird auf ein 19 cm breites und 45 cm langes What-

man-Nr. 3-MM-Papier, das vorher in Phosphatpuffer von pH 5,8 (nach Soerensen [Klein, 1932]) getränkt worden war, auf eine mittlere Querlinie aufgetragen (Menge: etwa 1 ml). Dieses Papier wird in die Elektrophoresekammer gebracht und an beiden Enden (je etwa 5 cm) in Pufferlösungen (Phosphatpuffer, pH 5,8 wie oben) gehängt, die mit Anode und Kathode in Verbindung stehen. Nach einer Laufzeit von vier Stunden bei 20 mA wird unterbrochen, das Papier herausgenommen und von der Mitte aus beidseitig mit einer Rasierklinge in je zehn 1 cm breite Querstreifen geschnitten. Von jedem Querstreifen wird ein Drittel in 2 ml Hydrochinonlösung (1 g/L), ein Drittel in 2 ml Gallussäurelösung (2 g/L) und ein Drittel in 2 ml Gallussäure-n-propylesterlösung (2 g/L) (in mit Stanniolfolien verschlossenen Reagenzgläsern) gelegt und hernach während sechs Tage bei 45 °C inkubiert und darauf im Papierchromatogramm (Whatman Nr. 1, Lösungsmittelgemisch 313 [Schmidt, 1952], Reagens: ammon. Silbernitratlösung) geprüft. Hierzu muß möglichst quantitativ gearbeitet werden. Auf diese Weise kann die Wirkung der einzelnen durch die Elektrophorese getrennten Fermente je auf die drei verschiedenen Fermentsubstrate verfolgt werden (siehe auch Erläuterung im Schema Abb. 1). In Abb. 2 ist die Trennung der esterspaltenden und der gallussäure- und hydrochinonspaltenden *Endothia*-Enzyme graphisch dargestellt. Gallussäure und Hydrochinon scheinen nach unseren Versuchsergebnissen von ein und demselben Enzym (der Pyrogallase) abgebaut zu werden.

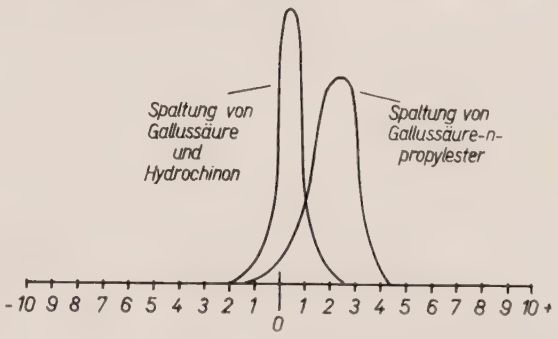


Abb. 2. Die Trennung von Pyrogallase und Esterase mit der Papierelektrophorese. (Die Zahlen von — 10 bis + 10 entsprechen den aus dem Elektrophoresepapier herausgeschnittenen Querstreifen von je 1 cm Breite. 0 = Startlinie. Die Trennung ist schematisch durch Kurven dargestellt)

9. Schlußfolgerung

In der vorliegenden Arbeit sind eine tanninspaltende Esterase und eine gallussäure-, hydrochinon- und pyrogallolspaltende Pyrogallase beschrieben worden. Diese beiden Enzyme werden von den drei untersuchten phytopathogenen Pilzen sowohl in vitro als auch in vivo gebildet. Es wurden untersucht: *Endothia parasitica* (Murr.) And., *Herpotrichia nigra* Hart. und *Trametes radiciperda* Hart., also je ein Erreger einer Rindenkrankheit, einer Nadelkrankheit und einer parasitischen Holzfäule. Aus Tastversuchen wissen wir, daß bei weiteren Pilzen die gleichen Fermente wirken (z. B. bei einer *Alternaria*-Spezies). Wahrscheinlich sind sie bei Pilzen ganz allgemein sehr häufig. Die Aktivität (entsprechend der Enzymoproduktion) ist aber, wie wir bei *Trametes radiciperda* feststellen konnten, von Rasse zu Rasse verschieden. — Überall, wo diese Fermente in vivo, d. h. im Er-

reger-Wirt-Verhältnis wirken, ist es ausgeschlossen, daß Tannine, Gallussäure und verschiedene Phenole als Resistenzfaktoren gelten können. Diesen Gerbstoffen und Phenolen ist vermutlich in dieser Hinsicht zu große Bedeutung beigemessen worden.

Zusammenfassung

1. Esterase und Pyrogallase werden von verschiedenen phytopathogenen Pilzen in vitro und in vivo gebildet und sind für den Abbau von Tanninen, Gallussäure und verschiedenen Phenolen verantwortlich.
2. Es werden Methoden besprochen, mit deren Hilfe die Fermentaktivität gemessen und die Enzyme getrennt nachgewiesen werden können.
3. Versuche mit verschiedenen Fermentsubstraten und -inhibitoren zeigten, daß beide Enzyme sehr stabil sind und einen relativ breiten thermischen Wirkungsbereich aufweisen.
4. Das Wirken dieser Fermente in vivo schließt Tannine, Gallussäure und verschiedene Phenole als Resistenzfaktoren aus.

Summary

1. Esterase and pyrogallase activity were detected in vitro and in vivo from various phytopathogenic fungi. These enzymes were responsible for the breakdown of tannins, gallic acid and various phenols.
2. Methods are described for the measurement of enzyme activity and for the separation of the two enzymes.
3. Experiments with normal enzyme inhibitors showed that the enzymes were relatively stable, although glucose and hydrochinon were inhibitory for pyrogallase. Both enzymes were stable over a wide temperature range.
4. The in vivo action of these enzymes would appear to exclude the function of tannins, gallic acid and phenols as factors in the disease resistance of the hosts.

Literaturverzeichnis

Bazzigher, G. (1955): Über tannin- und phenolspaltende Fermente von *Endothia parasitica*. Phytopath. Z. **24**, 265—282.

Foster, J. W. (1949): Chemical activities of fungi. Academic Press Inc., Publ., New York, 648 S.

Klein, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse. Verlag J. Springer, Wien 1932.

Nicholson, W. N., M. Nierenstein, J. C. Pool and N. V. Price (1931): The action of Tannase on Gallotannin. Biochem. J. **25**, 752—755.

Schmidt, O. Th., und D. M. Schmidt (1952): Umwandlung von Chebulagsäure in Corilagin. XIV. Mitteilung über natürliche Gerbstoffe. J. Liebigs Annalen der Chemie, **578**, 1, S. 29.

Toth, G., and G. Barsony (1943): Enzymologia **11**, 19—23.

Aus dem Institut für physiologische Botanik
der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig

Vergleichende chemische Untersuchungen des Atmungsstoffwechsels von Weizenkeimpflanzen unterschiedlicher Braunrostanfälligkeit

Von

K. Hassebrauk und R. Kaul

Mit 6 Abbildungen

Die mehr oder weniger große Widerstandsfähigkeit einer Wirtspflanze gegen Krankheitserreger gründet sich zum Teil auf Eigenschaften, die der Wirt bereits vor der Infektion aufweist (Axenie, passive Resistenz), kann aber darüber hinaus in von Fall zu Fall unterschiedlichem Ausmaß, gelegentlich vielleicht sogar ausschließlich, durch die aus dem Widerspiel der beiden Partner resultierenden Reaktionen bedingt sein (aktive Resistenz). Gäumann (18) bezeichnet die passive Resistenz als mangelnde Eignung und die aktive Resistenz als mangelnde Geneigtheit eines Wirts. Eine sichere Trennung dieser beiden Resistenzformen dürfte in vielen Fällen kaum möglich sein, wenn wir von den strukturell bedingten axenischen Faktoren absehen; wo und in welchem Umfange eine kausale Verknüpfung zwischen ihnen besteht, können wir in der Regel nur vermuten. Beide Erscheinungsformen der Resistenz sind häufig verschieden stark ontogenetisch oder durch Umwelteinflüsse modifizierbar, wobei die Sachlage zusätzlich noch dadurch kompliziert werden kann, daß, wie z. B. bei den Rostpilzen, der Infektionstypus und die Befallsstärke, d. h. die Fruktifikationsintensität, oft unterschiedlich, ja, sogar gegensinnig beeinflußt werden können (vgl. S. 321).

Wir sind heute in der Deutung der Resistenzvorgänge chemischer und physikalisch-chemischer Natur, wie sie sich unmittelbar zwischen dem Erreger und den einzelnen Wirtszellen abspielen, vielfach über theoretische Vorstellungen noch nicht hinausgekommen. Das gilt besonders für die Rostpilze, bei denen wegen ihres obligaten Parasitismus eine experimentelle Klärung ungemein erschwert oder zunächst sogar unmöglich gemacht wird. Die hochgradige physiologische Spezialisierung, wie sie uns bei den Getreiderosten entgegentritt, bereitet sogar jedem theoretischen Deutungsversuch größte Schwierigkeiten. Es ist nicht beabsichtigt, an dieser Stelle im einzelnen auf die Hypothesen einzugehen, die über das Problem der physiologisch

bedingten Anfälligkeit bzw. Resistenz bei den Getreiderosten entwickelt sind. Aus der mittlerweile sehr umfangreich gewordenen Literatur verweisen wir nur auf CHESTER (11, 12), BROWN (7, 8), RÖMER, FUCHS und ISENBECK (48), HUMPHREY und DUFRENOY (29), THATCHER (54), DALY (13), HART (21), SEMPIO (52), GÄUMANN (18), WALKER und STAHMANN (55) und die dort berücksichtigten einschlägigen Veröffentlichungen.

Die experimentellen Befunde, die zur Untermauerung der verschiedenen Hypothesen dienten, sind zum Teil nach recht globalen chemischen Untersuchungsverfahren gewonnen, zum Teil aus einseitigen Prüfungen hervorgegangen, so daß sie dem zweifellos äußerst komplexen Bilde des Resistenzphänomens nicht gerecht werden und immer wieder Widerspruch oder zumindest Zweifel an ihrer über den Einzelfall hinausgehenden Gültigkeit hervorgerufen haben. Wir haben uns daher entschlossen, das Problem der physiologisch bedingten Rostresistenz beim Getreide erneut aufzugreifen, wobei uns vor allem folgende Erwägungen leiteten: Bis auf wenige Ausnahmen liegen bis heute keine experimentell gesicherten feineren Erkenntnisse über den Stoffwechsel im weitesten Sinne bei Getreidepflanzen vor. Eine systematische Bearbeitung aller Prozesse und eine Analyse der Stoffwechselprodukte an Sorten mit möglichst extremem Rostverhalten bzw. an labilen Sorten nach Anzucht bei stark modifizierenden Umweltverhältnissen könnte möglicherweise dazu beitragen, einen Zusammenhang der Resistenzerscheinungen mit bestimmten physiologischen Prozessen bzw. Stoffwechselprodukten aufzudecken oder einen Einblick in jene Vorgänge zu gewinnen, die an der Modifikation der Befallsstärke beteiligt sind.

Es ist nicht zu erwarten, daß alle erzielten Ergebnisse im Hinblick auf die komplexe Natur der Resistenzerscheinungen zunächst mehr als Teilergebnisse sind. Äußere Umstände zwangen uns außerdem, über unsere ersten Untersuchungen schon jetzt zu berichten, obwohl sie keineswegs in dem von uns ursprünglich geplanten Umfange durchgeführt werden konnten und daher in vielen Punkten noch ergänzungsbedürftig sind.

Unsere Arbeiten sind durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht worden. Wir sprechen dafür unseren Dank aus.

Versuchsplan und allgemeine Versuchsdurchführung

Während GASSNER und HASSEBRAUK (19) früher die Schlüsselstellung für die Resistenzvorgänge im Stickstoffstoffwechsel der Getreidepflanzen vermuteten, erschien es uns zweckmäßiger mit einer Untersuchung des Atmungsstoffwechsels zu beginnen, zumal ja durch zahlreiche Autoren nachgewiesen ist, daß zwischen der Atmungsintensität einer Wirtspflanze und ihrem Resistenzverhalten Beziehungen bestehen. Es soll hier nicht erörtert werden, inwiefern es sich hierbei jeweils um Ursache oder Wirkung handelt.

Im Gegensatz zu KIRÁLY und FARKAS (15, 37, 38) u. a., die in den letzten Jahren über ähnliche Untersuchungen an rostinfizierten Blättern berichteten, haben wir zur genaueren Charakterisierung der Atmung an u n g e i m p f t e n Weizenkeimpflanzen bekannten Verhaltens gegenüber

Braunrost detaillierte Aktivitätsbestimmungen der drei Endoxydationssysteme durchgeführt und die Peroxydase getestet. Gleichzeitig haben wir versucht, Substanzen, die in die Endoxydation bestimmend eingreifen, wie Ascorbinsäure und Phenole, quantitativ zu erfassen. Um indirekt einen Überblick über den Gesamtumsatz der Weizenpflanzen zu erhalten, wurden die Zucker und Säuren im Zellsaft papierchromatographisch getrennt.

Als Untersuchungsmaterial dienten uns einmal zwei Weizensorten, die sich durch ihre starken Resistenzunterschiede gegen *Puccinia triticina* auszeichnen, Michigan Amber (*Triticum aestivum* var. *milturum*) und *T. monococcum* var. *hornemanni*. Michigan Amber ist nach unseren heutigen Kenntnissen nicht nur gegen alle Braunrost-, sondern darüber hinaus auch gegen alle Gelbrost- und Schwarzrostrassen hoch anfällig. *T. monococcum* ist gegen die meisten Rassen des Weizenbraunrostes und Gelbrostes hoch resistent. Gegenüber Schwarzrost besteht ein unterschiedliches Verhalten. Wir verfügen aber bekanntlich über keine Weizensorte, die generelle Resistenz gegen alle drei Rostarten aufweist. (Wobei es überhaupt noch dahingestellt bleiben muß, inwieweit wir berechtigt sind, bei den drei Spezies gemeinsame Grundlagen ihres Infektionsverhaltens zu unterstellen.) Zu einigen Vorversuchen wurde auch Chinese 166 verwendet, ein Weizen, der sich durch eine weitgehende Resistenz gegen europäische Gelbrostrassen auszeichnet.

Diese Sortenversuche wurden durch Analysen von Keimpflanzen einiger anderer Sorten ergänzt, die unter unzusagenden Belichtungsverhältnissen angezogen oder durch Behandlung mit chemischen Agenzien in ihrem Resistenzverhalten verändert worden waren. Es wurden hierzu vor allem Brevit und Strubes Dickkopf verwendet.

Die Variierung der Belichtung erschien uns besonders erfolgversprechend, da bei der Pathogenese gerade der Lichtfaktor eine bedeutsame Rolle spielt. Es wird hierzu später noch ausführlich Stellung zu nehmen sein. Wir haben in unseren Untersuchungen normal belichtete (etwa 16 Std.) und nur sechs Stunden (von 9 bis 15 Uhr) belichtete Pflanzen der Sorte Brevit vergleichend geprüft. Am Tage der Verarbeitung wurden die Pflanzen nur drei Stunden belichtet und dann abgeerntet. Eine geringe Erhöhung der relativen Luftfeuchtigkeit um etwa 5 % bei den unter einem großen Dunkelsturz angezogenen Pflanzen wurde dabei in Kauf genommen, da sich bei der Kultur im Gewächshause derart geringe Schwankungen in der Luftfeuchtigkeit erfahrungsgemäß auf das Resistenzverhalten nicht auswirken.

Wie durch unterschiedliche Belichtungsdauer kann das Anfälligkeitsverhalten von Getreidepflanzen gegen Rostpilze, wie wir wissen, auch durch gewisse Fermentgifte stark beeinflußt werden (z. B. Chloroform: Gassner und Hassebrauk, 19 u. a.; Maleinsäurehydrazid: Bromfield and Peet, 5; Livingston, 39). In Vorversuchen haben wir verschiedene Fermentgifte, die den Pflanzen mit der Nährlösung durch die Wurzeln zugeführt wurden, daraufhin geprüft, ob sie die Stärke des Rostbefalls verändern. Fluorid (10^{-3} und 10^{-4} n) und Diäthyldithiocarbamat (10^{-3} und 10^{-4} n) zeigten keine merkliche Wirkung auf den Rostbefall wie auf das Wachstum der Keimlinge. Cyanid (10^{-4} n) hemmte den Pflanzenwuchs beträchtlich, rief jedoch keine

markanten Befallsänderungen hervor. Dagegen wirkten Arsenat (10^{-3} n) und Jodessigsäure (10^{-3} n) sehr stark befallsfördernd und verkürzend auf die Fruktifikationszeit. Das Wachstum der Wirtspflanzen wurde gleichzeitig erheblich beeinträchtigt. Während jedoch nach Arsenatgaben die Grünfärbung der Pflanzen unverändert erhalten blieb, trat bei Zufuhr von Jodacetat allgemeine Chlorose auf. Daß das Chlorophyll nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Rostentwicklung steht, ist durch die Untersuchungen von WU (58), SAYED et al. (50) an albinotischen Gersten- bzw. Maislinien erwiesen und läßt sich jederzeit demonstrieren, wenn man, wie erstmals MAINS (41), etiolierte Pflanzen bei gleichzeitiger Verabfolgung von Saccharose, Glukose oder anderen löslichen Kohlenhydraten mit Rost beimpft (vgl. auch POHJAKALLIO, 46). Es ist nun aber bemerkenswert, daß in unseren, allerdings relativ kurzfristigen Versuchen den mit Jodacetat behandelten Pflanzen keine Kohlenhydrate gegeben wurden.

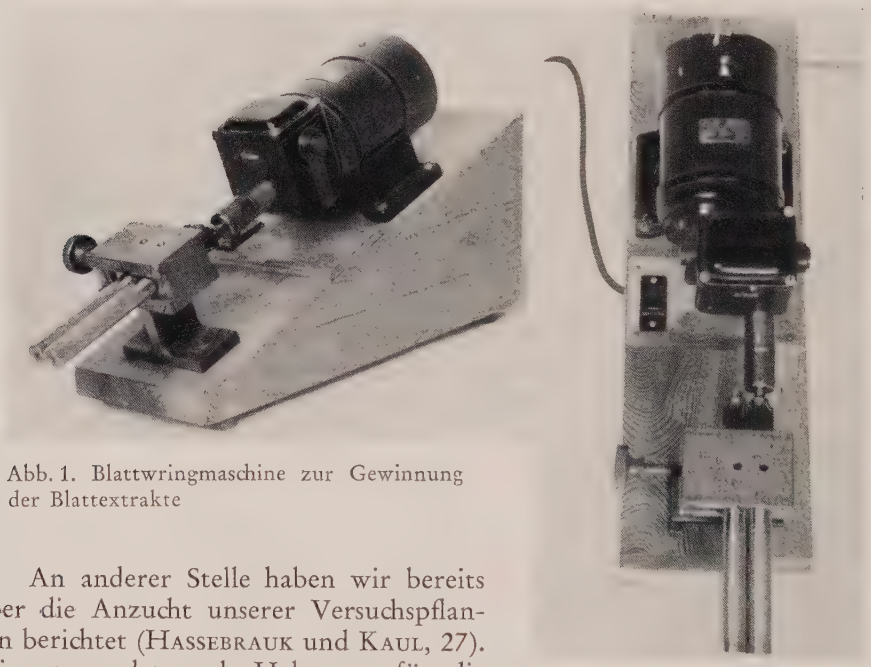


Abb. 1. Blattwringmaschine zur Gewinnung der Blattextrakte

An anderer Stelle haben wir bereits über die Anzucht unserer Versuchspflanzen berichtet (HASSEBRAUK und KAUL, 27). Wir verwendeten als Halterung für die Keimpflanzen Kunstschaumplatten*). Nach vier- bis sechstägiger Vorkultur auf Wasser in Entwicklerschalen wurden die Schaumplatten auf Zylindergläser mit Nährlösung (v. d. Elst, s. SCHROPP, 51) umgesetzt. Hier wurden sie etwa eineinhalb Wochen belassen und anschließend auf gleiche Gläser mit gleicher Nährlösung, die jedoch zusätzlich die erwähnten Fermentgifte enthielten, übertragen. Alle Versuche wurden im Gewächshause bei 20 bis 25 ° C durchgeführt.

*) Den Contiwerken, Hannover, danken wir für die Überlassung der Kunstschaumplatten (Polyurethan).

Zur Gewinnung aller Inhaltsstoffe und Enzymsysteme wurden die Pflanzen im Alter von 15 bis 17 Tagen vormittags zwischen 11 und 12 Uhr abgeschnitten und sofort in einer Blattwringmaschine mit V_2A-Stahlwalzen (Abb. 1) ausgepreßt*). Es ist hiermit eine restlose Gewinnung des Preßsaftes möglich; auf den Walzen bleiben nur die grobfaserigen Gerüstsubstanzen zurück.

Vergleichende Untersuchungen über die Aktivität des Cytochromsystems

Aktivitätsmessungen des Cytochromsystems an grünen Weizenblättern liegen unseres Wissens nicht vor. Waygood (56) hat an einfachen Phosphatpufferextrakten aus 25 bis 70 Stunden alten etiolierten Weizenkeimen manometrische Messungen durchgeführt. Als Sauerstoffakzeptor diente ihm p-Phenylendiamin; zusätzlich mischte er nach Goddards (20) Methode Cytochrom c aus Rinderherzen den Enzymlösungen bei, wodurch die Sauerstoffumsätze beträchtlich gesteigert wurden.

Für feinere Messungen schien uns das von Waygood gewählte Verfahren ungeeignet. Die Oxydation des p-Phenylendiamins erfolgt bei dieser Methode nicht ausschließlich über das Cytochromsystem; zahlreiche andere oxydierende Fermente und Zellinhaltsstoffe verfälschen leicht das Ergebnis, so daß mit differenzierten Methoden die Resultate korrigiert werden müssen. Ferner arbeitet Waygood mit annähernd farblosen Homogenisaten, was uns im Hinblick auf unsere Fragestellung nicht möglich war. Aus diesem Grunde konnten wir auch keine spektrochemischen Messungen vornehmen, wie sie Lundegårdh (40) an Weizenwurzeln durchgeführt hat.

Die Isolierung von Cytochrom aus Weizenkeimpflanzen wäre nach der Methode von Goddard (20) möglich, doch würden hierzu sehr große Mengen Pflanzenmaterial benötigt. Außerdem wäre mit einer Cytochrombestimmung noch nichts über die Aktivität des Cytochromsystems gesagt.

In Anlehnung an ein Verfahren von Straus (53) wurde schließlich von uns der Weg gewählt, die Eigenschaft des Cytochromsystems, p-Aminodiäthylanilin und α-Naphthol oxydativ zu Indolphenolblau zu kuppeln, zur quantitativen Bestimmung seiner Aktivität zu benutzen. Zu diesem Zweck mußte das System isoliert werden, was nach mehreren vergeblichen Vorversuchen in folgender Weise gelang:

Die Isolierung des Cytochromsystems

3 ml Pflanzenquetschsaft werden in einem 15-ml-Schleuderglase mit 0,075 ml 8-normalen Acetatpuffers (pH 4,0) versetzt und in einer Kältemischung von — 2 ° C aufbewahrt. Nach einer Stunde werden die geflockten Proteinanteile bei 3300 g abgeschleudert; die überstehende Lösung wird verworfen, da sie keine Cytochromoxydaseaktivität aufweist. Das Zentrifugat wird erneut abgekühlt, dann in 10 ml eiskalten Wassers aufgenommen und

*) Die Blattwringmaschine ist im Institut für Serologie der Biologischen Bundesanstalt in Gemeinschaftsarbeit entwickelt worden. Wir danken dem Leiter des Instituts, Herrn Regierungsrat Dr. Bercks, für die Überlassung der Maschine.

intensiv geschüttelt. Durch sofortiges Zentrifugieren, möglichst in einer Kühlzentrifuge bei 0 °, wird die Waschflüssigkeit von den unlöslichen Anteilen getrennt. Die Waschflüssigkeit wird vom Sediment abgesaugt und das Schleuderglas in Eiswasser gestellt. Nun pipettiert man 2 ml 0,1 m sekundäre Kaliumphosphatlösung in das Glas und rührt bei etwa 2000 U/min eine Stunde lang. Dabei darf das Glas nicht aus dem Eiswasser entfernt werden. Schließlich wird bei 3300 g 10 min zentrifugiert, so daß eine klare, schwach gelbgrün gefärbte Flüssigkeit übersteht. Sie enthält Cytochrom, einschließlich Cytochromoxydase. Das System behält seine Wirksamkeit bei kühler Aufbewahrung unvermindert für zwei bis drei Stunden bei.

Die Bestimmung der Cytochromoxydase-(Indophenoloxydase-)aktivität

5 ml m/15 Phosphatpuffer von pH 7,1 werden in KPG-Reagenzgläser einpipettiert. In Anlehnung an die Methode von STRAUS werden nun 0,5 ml einer 0,1%igen α-Naphthollösung (gelöst in 11 % Äthanol) und 0,7 ml einer frisch bereiteten wässrigen p-Aminodiäthylanilinlösung (0,1 %) hinzugegeben. In möglichst kurzem Abstande werden 2 ml obiger Fermentlösung bzw. 2 ml Wasser (Blindprobe) beigemischt. Die Blindprobe dient zum Vergleich, um direkt die Farbstoffbildung zu eliminieren, die durch Autoxydation erfolgt.

Die Änderungen der Farbtiefe wurden von uns im Universalkolorimeter „Lange" mit vorgesetztem Rotfilter und angeschlossenem Multiflexgalvanometer verfolgt. Es wurde im Abstande von 15 min gemessen, währenddessen die Meßgläser im Dunkeln aufbewahrt wurden.

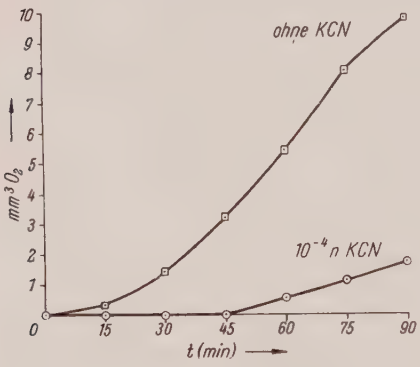


Abb. 2. Cytochromoxydaseaktivität im Quetschsaft von Strubes Dickkopf ohne und mit Zugabe von Cyanid. Die Angaben beziehen sich auf 2 ml Quetschsaft.

Zur Umrechnung auf den im Oxydationsprozeß umgesetzten Sauerstoff wurde die Extinktion bekannter Indophenolmengen ermittelt und eine Eichkurve dargestellt.

Ein Probeversuch, bei dem die Wirkung von Cyanid auf die Cytochromoxydaseaktivität geprüft wurde, brachte das Ergebnis, daß 10^{-4} n Cyanid das System fast vollständig blokkiert (Abb. 2).

In Tabelle 1 sind nun die Cytochromoxydaseaktivitäten in den vergleichsweise untersuchten Quetschsäften eingetragen.

Sowohl beim Sortenvergleich wie auch beim Licht-Dunkelversuch und beim JES-Versuch treten die deutlich höheren Sauerstoffumsätze der Pflanzen hervor, die verglichen mit ihrem Partner eine geringere Eignung für Braunrostbefall zeigen. Wenn Strubes Dickkopf ohne Jodacetatgabe in seinen absoluten Werten so hoch liegt wie der äußerst resistente *T. mono-*

Tabelle 1

Vergleichende Untersuchungen über die Aktivität des Cytochromsystems bei Weizenkeimpflanzen mit relativ hoher (+) und relativ geringer (—) Braunrostanfälligkeit

Vergleichsteste[1])		Sauerstoffumsätze in mm^3/2 ml Quetschsaft nach 30 min	60 min
Sortenvergleich:	Michigan Amber +	1,0	4,1
	T. monococcum —	2,7	7,1
Licht-Dunkelversuch, Brevit:	16 Std. Licht +	0,5	2,6
	6 Std. Licht —	1,4	3,9
Jodessigsäureversuch, Strb. Dickkopf:	+ 10^{-3}n JES +	2,6	5,9
	— JES—	3,0	7,0

[1]) Die Werte der drei Versuchsvariationen sind nicht untereinander vergleichbar, da die Auswertungen an verschiedenen Tagen erfolgten.

coccum, so sei, wie in der Anmerkung zu der Tabelle, nochmals ausdrücklich darauf hingewiesen, daß ein Vergleich der drei Variationsgruppen unter sich nicht zulässig ist. Dennoch läßt sich aussagen, daß in allen Fällen die Sauerstoffumsätze des Cytochromsystems, verglichen mit den später noch zu besprechenden Umsätzen, wie sie durch Ascorbinsäureoxydase und auch Peroxydase erzielt werden, gering sind. Da Weizenkeime relativ viel Cytochrom enthalten (Goddard, 20; Waygood, 56), scheint schon in der ersten Jugendentwicklung die Beteiligung des Cytochromsystems an der biologischen Oxydation rapide zurückzugehen. Unsere Befunde decken sich mit entsprechenden Befunden von Albaum und Eichel (1) an Haferkeimlingen, von James (30, 31) und Waygood (56) an Weizen- und Gerstenkeimpflanzen und von Merry und Goddard (42) gleichfalls an Gerstenkeimpflanzen. Nur Haskins (23) fand bei Mais das Gegenteil, nämlich Zunahme im grünen Keimling gegenüber dem Embryo. In Wiederholungen zu unseren Versuchen fanden wir niemals dieselben Zahlenwerte, da trotz der angestrebten Kongruenz der Umweltverhältnisse die Pflanzen doch von Versuch zu Versuch in ihrem physiologischen Verhalten etwas voneinander abwichen. Aber wenn sich auch die absoluten Werte nicht reproduzieren ließen, konnte doch stets die gleiche Tendenz und annähernd die gleiche Relation in den Vergleichsserien beobachtet werden; besonders gilt das für die ausgeprägten Unterschiede zwischen Michigan Amber und *T. monococcum*.

Untersuchungen über die Aktivität des Ascorbinsäureoxydase- und Polyphenolasesystems

Zur Ermittlung der Aktivität des Ascorbinsäureoxydase- und Polyphenolasesystems wäre die Anwendung der Warburgtechnik der gangbarste Weg gewesen. Da keine Warburgapparatur zur Verfügung stand, wurden die verschiedenen Aktivitäten an der Oxydation der Ascorbinsäure zu

Dehydroascorbinsäure gemessen. Von einer Isolierung beider Systeme wurde abgesehen.

Zunächst wurde die Ascorbinsäureoxydation durch reinen Preßsaft ermittelt. Die Steigerung des Ascorbinsäureverbrauchs nach Zusatz von Brenzkatechin sollte über die Aktivität des Polyphenolasesystems Auskunft geben; die Ergebnisse dieser Versuche sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da die Polyphenole, die mit dem Pflanzenquetschsaft zugesetzt wurden, den Sauerstoff erschöpfend übertragen konnten. Es erscheint deshalb angebracht, die Sauerstoffumsätze beider Systeme summarisch zu betrachten.

Ansätze: 25 mg Ascorbinsäure wurden in 100 ml n/15 Phosphatpuffer von pH 5,9 gelöst. Dadurch sank der pH-Wert auf 5,6 bis 5,7, d. h. zu dem optimalen Bereich für die Aktivität der Ascorbinsäureoxydase aus Weizenquetschsaft. Das entsprechende Optimum der Polyphenolase lag zwar etwa $^3/_{10}$ pH-Einheiten höher, doch konnte dieser geringe Unterschied unberücksichtigt bleiben.

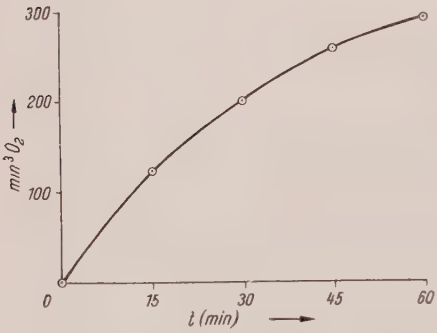


Abb. 3. Der zeitliche Verlauf der Ascorbinsäureoxydation durch Quetschsaft von Brevit. Die Angaben beziehen sich auf 2 ml Quetschsaft

Die Ascorbinsäurelösung wurde zu je 10 ml in vier 50-ml-Erlenmeyerkolben einpipettiert und mit

a) 2 ml Quetschsaft,
b) 2 ml Quetschsaft,
c) 2 ml Wasser (Blindoxydationskontrolle),
d) 2 ml Quetschsaft + 0,05 ml einer 0,264%igen wässerigen Brenzkatechinlösung (Endkonzentration 10^{-4} mol)

vermischt. Zur Lösung a wurden sofort 8 ml 5%iger frisch bereiteter Metaphosphorsäurelösung hinzugegeben. Die Lösungen b, c und d wurden in eine Schüttelmaschine gesetzt und eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur geschüttelt. Wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist, war eine halbe Stunde die günstigste Versuchsdauer. In der Zwischenzeit wurde die Lösung a bei 3000 g zentrifugiert und wurden sofort 2 ml der überstehenden klaren Lösung mit n/1000 Dichlorindophenol-Lösung (DIP) titriert. Dieses Verfahren zur Bestimmung der Ascorbinsäure ist ein Teil der kombinierten Methoden von TILLMANS, VAN EEKELEN und EMMERIE (TEE-Methode, siehe PAECH und TRACEY, 44), bei welcher der Einfluß anderer Reduktone weitestgehend ausgeschaltet wird.

Nach Beendigung des Schüttelns wurden die Lösungen b, c und d sofort mit 8 ml 5%iger Metaphosphorsäurelösung versetzt und entsprechend der Lösung a weiterbehandelt. Nach Abzug des Blindoxydationswertes (Lösung c), der im allgemeinen sehr gering war, wurde der Umsatz ermittelt und stöchiometrisch auf mm^3 O_2 pro 2 ml Quetschsaft umgerechnet. Tabelle 2 gibt die so erhaltenen Werte der Fermentaktivitäten wieder.

Tabelle 2

Vergleichende Untersuchungen über die Aktivität des Ascorbinsäureoxydase-Polyphenolasesystems bei Weizenkeimpflanzen mit relativ hoher (+) und relativ geringer (—) Braunrostanfälligkeit

Vergleichsteste[1])			Sauerstoffumsätze in mm^3 O_2 je 2 ml Quetschsaft n. 30 min	
			Ohne Brenzkat.	mit Brenzkat.
Sortenvergleich:	Michigan Amber	+	246	246
	T. monococcum	—	302	319
Licht-Dunkelversuch, Brevit:	16 Std Licht	+	185	191
	6 Std. Licht	—	202	213
Jodessigsäureversuch, Strb. Dickkopf:	+ 10^{-3}n JES	+	235	246
	— JES	—	258	260

[1]) Siehe Anmerkung zu Tabelle 1.

Es zeigte sich somit, daß die Pflanzen mit erhöhter Eignung für Braunrostbefall eine geringere Ascorbinsäureoxydase-Polyphenolaseaktivität aufweisen. Besonders ausgeprägt waren auch hier wieder die Unterschiede zwischen den beiden Versuchssorten. Alle Ergebnisse waren, wenn auch nicht hinsichtlich der absoluten Werte, reproduzierbar.

Als Aktivatoren von Ascorbinsäureoxydase und Polyphenolase fungieren in besonderer Weise Kupfer-II-Ionen. Andere im Quetschsaft enthaltene Kupfer-II-Ionen sind jedoch auch zur Ascorbinsäureoxydation befähigt und können somit eine fermentative Wirkung vortäuschen. Wir hielten es für notwendig, diese pseudofermentative Ascorbinsäureoxydation festzustellen. Hierzu wurde mit Quetschsaft, der zur Zerstörung der echten Ascorbinsäureoxydase für 2 min auf 70 ° C erhitzt war, nach angegebener Methode Ascorbinsäure oxydiert. Dabei erhielten wir jedoch derart geringe Oxydationswerte, daß bei den in Tabelle 2 angegebenen Fermentaktivitäten keine Einschränkungen gemacht zu werden brauchen (Tab. 3).

Tabelle 3

Blindoxydation von Ascorbinsäure durch erhitzten Quetschsaft von *T. monococcum* im Vergleich zur echten, fermentativen Ascorbinsäureoxydation

Versuchsvariationen	Sauerstoffumsätze in mm^3 O_2 je 2 ml Quetschsaft nach 30 min	
	I	II
Quetschsaft 2 min auf 70 °	8	6
Quetschsaft nicht erhitzt	298	303

Die geringe Erhöhung des Ascorbinsäureverbrauchs nach Zusatz von Brenzkatechin (Tab. 2) deutet nur eine äußerst geringe Polyphenolaseaktivität in den Weizenblättern an. Durch eine andere Beobachtung wird dieser Befund bekräftigt: die auf Seite 316 beschriebenen Peroxydaseaktivitätsbestimmungen waren nur möglich, wenn Wasserstoffperoxyd den Enzymlösungen hinzugefügt wurde. Es fehlte also irgendwelches natives H_2O_2 im Preßsaft der Versuchspflanzen. Da nun durch die Wirkung von Polyphenolase im allgemeinen stets gewisse Mengen von Wasserstoffperoxyd gebildet werden, scheint Polyphenolase in Blättern von Weizenkeimpflanzen zu fehlen. Dieser Befund deckt sich mit den Angaben anderer Autoren für Getreideblätter (BROWN und GODDARD, 6; BONNER, 4; WAYGOOD, 56; JAMES, 30).

Bestimmung der Ascorbinsäuren und Polypenole

Zur besseren Charakterisierung der soeben aufgezeigten Ergebnisse hielten wir es für angebracht, diejenigen Inhaltsstoffe der Weizenblätter quantitativ zu bestimmen, die eine Schlüsselstellung in jenen Systemen innehaben: die beiden Ascorbinsäureformen und die Polyphenole.

Zur Bestimmung der Ascorbinsäure und der Dehydroascorbinsäure wurde das bereits erwähnte TEE-Verfahren (44) angewendet, eine kombinierte DIP-H_2S-Methode, die die Mitbestimmung anderer Reduktone fast vollständig ausschließt. Die einzige Abänderung des Verfahrens bestand darin, daß das Pflanzenmaterial nicht erst mit Quarzsand und Metaphosphorsäure verrieben wurde, sondern kurzerhand 2 ml Quetschsaft der Bestimmung zugrunde gelegt wurden.

Bei der Bestimmung der Polyphenole stießen wir auf Schwierigkeiten, da kein Verfahren dafür bekannt war. Schließlich stützten wir uns auf die Methode von CAMBER (10) zur Bestimmung mehrerer Phenole im menschlichen Blutserum. In Abänderung dieses Verfahrens gelangten wir schließlich zu folgendem Ansatz:

1 ml Quetschsaft wurde mit 1 ml 7%iger Trichloressigsäurelösung enteiweißt, 0,8 ml der überstehenden klaren Lösung wurden in ein 15-ml-Schleuderglas gegeben und 0,4 ml einer SO_2-stabilisierten 0,1%igen p-Aminodiäthylanilinlösung in Wasser hinzupipettiert. Diese Mischung wurde mit 1 ml einer 1%igen Silbernitralösung versetzt, wobei eine unbedeutende Menge Chlorid ausgefällt wurde. Schließlich wurde durch Zugabe von 1 ml 5%iger Boraxlösung die Reaktionsmischung alkalisch gemacht, wonach sofort die Oxydationswirkung des Silbernitrats einsetzte und sich schwarzes kolloidales Silber niederschlug. Das dabei aus den pflanzlichen Phenolen und dem p-Aminodiäthylanilin gebildete Indophenolblau ließ sich nach einer Minute quantitativ mit Chloroform extrahieren. Zur besseren Trennung beider Flüssigkeitsschichten schleuderten wir kurze Zeit bei 1000 g und saugten anschließend die überstehende wässrige Schicht mittels Glaskapillare und Wasserstrahlpumpe ab. Das blaugefärbte Chloroform füllten wir in trockene Schleudergläser und entfernten etwa noch vorhandene Trübungen bei 3300 g.

Die Reaktion ist quantitativ, wie die strenge Proportionalität der mit α-Naphthol aufgenommenen Eichkurve (Abb. 4) beweist. Die Ergebnisse der Untersuchungen ein und desselben Zellsaftes waren stets reproduzierbar, woraus wiederum auf die Exaktheit des Verfahrens geschlossen werden kann.

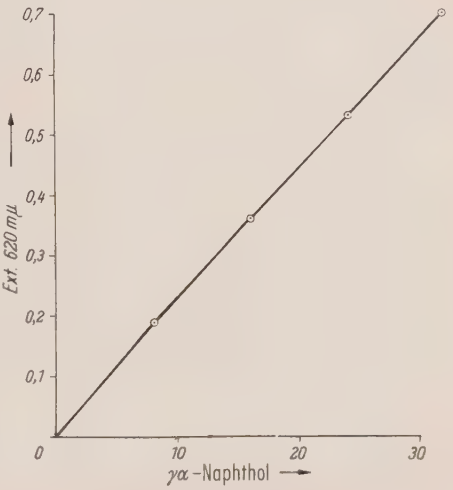


Abb. 4. Eichkurve zur Bestimmung phenolischer Körper im Pflanzenquetschsaft

Die Ergebnisse der Ascorbinsäure- und Phenolbestimmungen sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Die Befunde zeigen sowohl für den Ascorbinsäure- wie den Polyphenolgehalt von *T. monococcum* relativ hohe Werte gegenüber Michigan Amber. Bei *T. monococcum* war im enteiweißten Quetschsaft auch immer eine Rotfärbung durch Flavonole und Anthocyane zu beobachten. Da jene Farbstoffe zum größten Teil phenolischer Natur sind, scheint ihre Begleitung durch einen hohen Phenolspiegel gerechtfertigt. Beim Licht-Dunkelversuch und schwächer beim Jodessigsäureversuch waren gerade umgekehrte Beziehungen zu beobachten. Die Differenzen bei den Vergleichsbestimmungen waren besonders beim Jodessigsäureversuch nicht sehr ausgeprägt.

Tabelle 4

Vergleichende Bestimmungen des Ascorbinsäure- und Polyphenolgehalts in Pflanzen mit relativ hoher (+) und relativ geringer (—) Braunrostanfälligkeit

Vergleichsteste[1])			Ascorbinsäure in mg/ml Quetschsaft		Phenolische Körper in α-Naphtholeinheiten[2])
			Ascorbinsäure	Ascorbin- + Dehydroascorbinsäure	
Sortenvergleich:	Michigan Amber	+	3,10	4,75	80
	T. monococcum	—	4,65	6,65	114
Licht-Dunkelversuch, Brevit:	16 Std. Licht	+	1,45	2,40	90
	6 Std. Licht	—	1,00	2,00	81
Jodessigsäureversuch, Strb.	+ 10^{-3}n JES	+	1,25	2,20	56
Dickkopf:	— JES	—	1,20	2,15	54

[1]) Siehe Anmerkung zu Tabelle 1.

[2]) Die mit dem Pflanzensaft nach beschriebener Methode erhaltenen Extinktionswerte wurden in γ α-Naphthol/ml Quetschsaft nach Eichkurve (Abb. 4) angegeben.

Untersuchungen über die Aktivität des Peroxydasesystems

Die Aufgabe der Peroxydase im Stoffwechsel tierischer und pflanzlicher Organismen ist noch nicht hinreichend geklärt. Eine der Hauptaufgaben scheint die Spaltung der in der Endoxydation entstehenden Peroxyde zu sein. Inwieweit hier Katalase und Peroxydase konkurrieren, ist auch noch unklar.

In den in dieser Arbeit interessierenden Zusammenhängen schien die Peroxydase von Bedeutung, da sie enge Beziehungen zwischen der bereits behandelten Endoxydation und den ebenfalls erwähnten zelleigenen Phenolen herstellt: sie spaltet die in der Endoxydation gebildeten Peroxyde und überträgt den mobilisierten Sauerstoff auf den Wasserstoff der Phenole. Sie beschleunigt in dieser Weise die Endoxydation, da sie den Umweg des Peroxyd-Sauerstoffs über die Katalase ausschaltet.

Die methodischen Vorbereitungen zur Bestimmung der Peroxydaseaktivität gestalteten sich etwas umfangreich, weshalb sie auch an anderer stelle beschrieben wurden (KAUL, 36). Das dabei definitiv ausgearbeitete Verfahren wurde auf unsere Verhältnisse angewendet. Es ergaben sich dabei die in Tabelle 5 zusammengestellten Werte.

Tabelle 5

Vergleichende Untersuchungen über die durch Peroxydase maximal spaltbare Peroxydmenge

Vergleichsteste[1])			Maximal mögliche Sauerstoffumsätze in mm³/ ml Quetschsaft	
			Ext. 510 mμ[2])	nach 5 min
Sortenvergleich:	Michigan Amber	+	0,560	3250
	T. monococcum	—	0,405	2450
Licht-Dunkelversuch, Brevit:	16 Std. Licht	+	0,600	3500
	6 Std. Licht	—	0,560	3250
Jodessigsäureversuch, Strb. Dickkopf:	+ 10^{-3} JES	+	0,270	1550
	— JES	—	0,230	1325

[1]) Siehe Tabelle 1.

[2]) Die Extinktionswerte, aus denen mit Hilfe der Eichkurve nach KAUL (36) die O_2-Umsätze ermittelt wurden.

Die Resultate scheinen dafür zu sprechen, daß sowohl bei *T. monococcum* wie bei den verdunkelten und nicht mit Jodessigsäure behandelten Pflanzen die Peroxydaseaktivität geringer ist. Diese Aussage kann jedoch nur mit Vorbehalt gemacht werden, da bei Nebenuntersuchungen beobachtet wurde, daß die Peroxydase von Weizenkeimpflanzen kurzfristig ihre Aktivität ändern kann. Es zeigte sich, daß die Dunkelpflanzen während der Dunkelbehandlung eine weit höhere Aktivität aufwiesen als die Hellpflan-

zen, daß ihre Aktivität jedoch im Licht binnen 60 Minuten unter den Wert der Hellpflanzen absank (siehe Abb. 5).

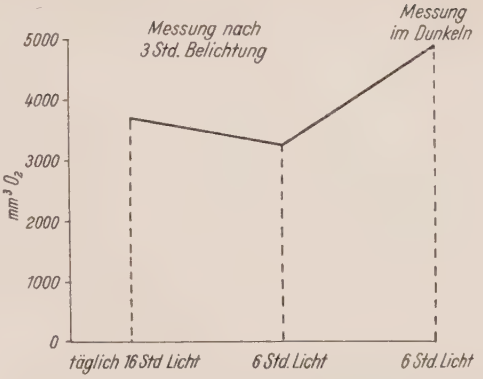


Abb. 5. Änderungen der Peroxydaseaktivität in Abhängigkeit von der Belichtung der Versuchspflanzen. Sorte: Brevit. Angaben in mm³ O_2 je ml Quetschsaft für 5 Minuten Testzeit

Nicht nur bei der Endoxydation, sondern auch beim oxydativen Aminosäureabbau und anderen fermentativen Prozessen entstehen in der Pflanze Peroxyde. Da diese Peroxydbildung im Dunkeln stärker ist als im Licht, kann auch die Peroxydaseaktivität entsprechend verschieden sein. Nach den Untersuchungen an anderen Objekten könnte es im übrigen für die Peroxydase charakteristisch sein, daß sie erst während der Pathogenese beziehungsreiche Aktivitätsänderungen aufweist (Rubin und Arzichowskaja, 49).

Die papierchromatographische Trennung verschiedener Zucker und Säuren aus Quetschsaft von Weizenblättern

Die in den vorstehend beschriebenen Untersuchungen immer wieder beobachteten Unterschiede in der Endoxydationsaktivität ließen es wünschenswert erscheinen, einen Überblick über die Zucker und Säuren des Grundstoffwechsels zu gewinnen, da ja zwischen Endoxydation und Grundstoffwechsel enge Beziehungen bestehen.

Zunächst wurden die mehr als Reservestoffe fungierenden Zucker papierchromatographisch getrennt, was mit dem Lösungsmittelgemisch von Dedonder (nach Paech und Tracey, 44) gelang. Über die zur Zucker- und Säuretrennung notwendigen Vorarbeiten wurde von uns bereits an anderer Stelle (27) berichtet. Das dort angegebene Säure-Chromatographieverfahren nach Jones et al. (32) wurde ebenfalls wieder angewendet.

Die von den Chromatogrammen angefertigten Pausen sind in Abbildung 6 wiedergegeben. Zur besseren Erkennung wurden Glukose und Fruktose mit spezifischen Reagenzien (Anilinphtalat bzw. Triphenyltetrazoliumchlorid) angefärbt. Die nur schwach hervortretende Maltose wurde nicht gepaust.

Michigan Amber, ausreichend belichtete Pflanzen und mit Jodessigsäure behandelte Pflanzen enthalten relativ große Mengen Glukose und Fruktose. Bei den den Zwischenstoffwechsel widerspiegelnden Säuren — es konnten in Übereinstimmung mit James (30) nur Ascorbinsäure, Zitronensäure (Isozitronensäure), Oxal- und Äpfelsäure nachgewiesen werden — waren durch visuelle Auswertung der Chromatogramme keine drastischen Unterschiede festzustellen. Daß das Chromatogramm aber keine genaue Aussage zuläßt, ergibt sich aus den früheren Untersuchungen. Wie Tabelle 4

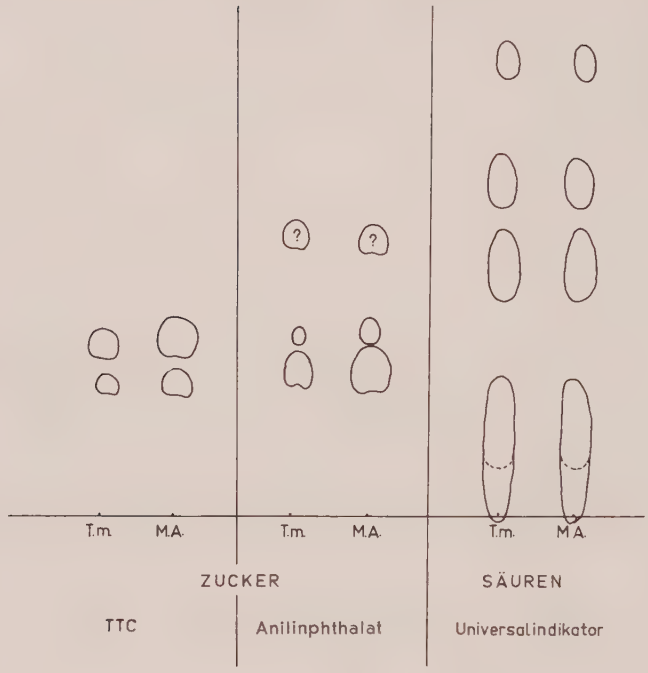
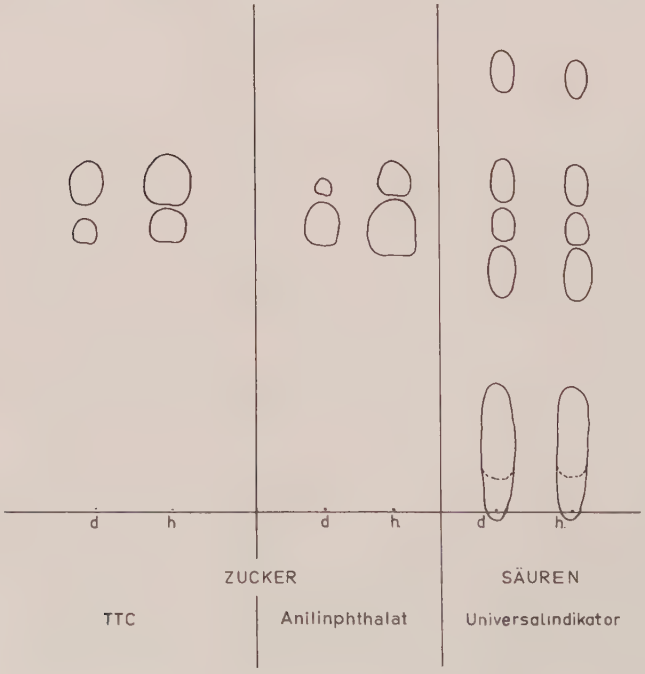


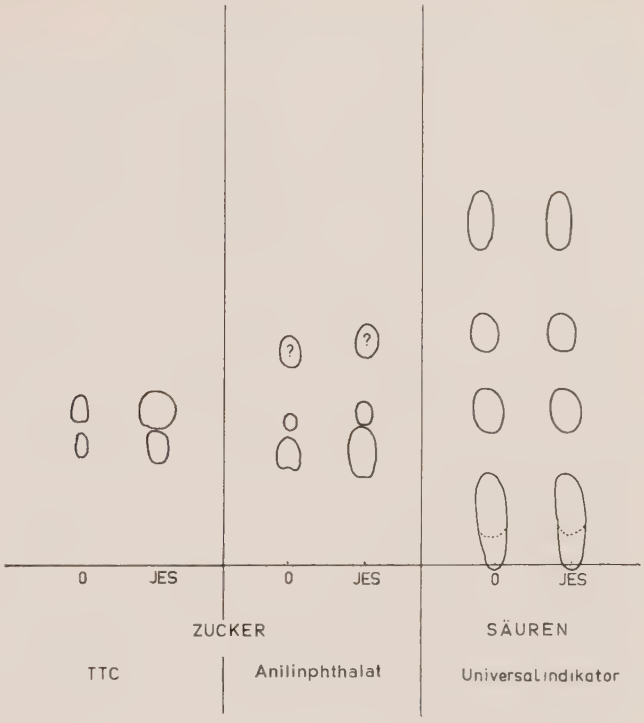
Abb. 6 a) bis c). Chromatogramme der Zucker und Säuren im Quetschsaft von Weizenkeimpflanzen.
Von unten nach oben: Zucker: Fruktose, Glukose (TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid). Säuren: Ascorbinsäure, Zitronensäure (Isozitronensäure), Oxalsäure, Äpfelsäure

a) Sortenvergleich (T. m. = *Triticum monococcum*, M. A. = Michigan Amber).



b) Licht-Dunkel-Versuch (d = Dunkelpflanzen, d. h. nur 6 Stunden täglich belichtet, h = Hellpflanzen, d. h. etwa 16 Stunden belichtet).

c) Jodessigsäureversuch (O = ohne JES. JES = + 10^{-3} n JES).



zeigt, sind z. B. Unterschiede für Ascorbinsäure einwandfrei vorhanden, treten jedoch auf dem Chromatogramm nicht sichtbar hervor. Die Differenzen müssen offenbar noch viel größer sein, um, wie bei den Zuckern, augenfällig zu erscheinen.

Ein wichtiges Ergebnis haben jedoch die papierchromatographischen Untersuchungen gebracht: die erhöhte Endoxydation berührt in der Hauptsache den Spiegel der Reservestoffe (Zucker), der folgerichtig absinkt. Der Zwischenstoffwechsel wird nur beschleunigt, ohne daß die Menge der entsprechenden Zwischenprodukte (Säuren) bedeutend verändert wird.

Unsere vorstehenden Ergebnisse aus den papierchromatographischen Untersuchungen weichen von den Befunden ab, die wir in unseren Vorversuchen bei einem Vergleich zwischen Michigan Amber und Chinese 166 erzielt hatten (27). Bei Chinese 166 wurden alle Säuren in geringerer Menge gefunden als bei Michigan Amber, während bezüglich der nachgewiesenen Zucker keine Unterschiede zwischen den Sorten erkennbar waren. Da Chinese 166 eine Sorte ist, die sich vor allem durch eine erweiterte Resistenz gegen europäische Gelbrostherkünfte auszeichnet, während sie gegenüber anderen Rostarten im allgemeinen hoch anfällig ist, verdient dieser Unterschied im Zwischenstoffwechsel der Sorten festgehalten zu werden. Er wird vielleicht einmal als ein Hinweis auf eine verschiedene Kausalität des Resistenzgeschehens bei den einzelnen Rostarten dienen können.

Besprechung der Ergebnisse

Unsere Befunde decken sich insofern mit den von anderen Autoren an Gramineenblättern gewonnenen Beobachtungen (vgl. James, 30), als die

Cytochromoxydase bereits in sehr frühen Entwicklungsstadien schnell zu schwinden scheint, daß Polyphenolase offenbar fehlt und daß die Ascorbinsäureoxydase die Endoxydase katexochen ist. Die für unsere Fragestellung wichtigen Aktivitätsbestimmungen haben ergeben, daß das (in seiner absoluten Höhe wenig wirksame) Cytochromsystem und das Ascorbinsäureoxydasesystem im Quetschsaft solcher Pflanzen eine erhöhte Aktivität aufweisen, denen nach der Infektion mit *Puccinia triticina* ein geringer bzw. ein vergleichsweise minderer Befallsgrad eigentümlich ist. Mit anderen Worten: „Respirationstypen" unter den Weizensorten und -pflanzen lassen nach der Infektion mit Braunrost einen geringeren Befall erkennen, womit noch nicht gesagt ist, daß alle Pflanzen mit geringerem Befall ohne weiteres in die Kategorie der „Respirationstypen" gehören. Denn primär haben, wie unsere nachstehenden Ausführungen zeigen werden, wahrscheinlich andere Faktoren darüber zu entscheiden, ob eine Wirtspflanze geeignet oder geneigt ist, eine Entwicklung des Rostpilzes überhaupt bzw. in mehr oder weniger beschränktem Umfange zuzulassen. Für diese unsere Auffassung sprechen auch die Ergebnisse der papierchromatographischen Untersuchungen der Zucker und Säuren. Denn wenn wir die eingangs bereits erwähnte bekannte große Bedeutung des Kohlenhydratangebots für die Fruktifikationsintensität berücksichtigen, ist ohne weiteres verständlich, daß Respirationstypen eine schlechtere „Eignung" für den Rostbefall aufweisen. Inwieweit sich der Atmungsablauf dieser Typen dagegen auf den Resistenz t y p u s mittelbar oder unmittelbar auswirkt, bleibe einstweilen dahingestellt.

Hinsichtlich der Peroxydase haben unsere Versuche gezeigt, daß die Aktivität dieses Ferments sich nach der Substratkonzentration richtet und daß nicht eine in engen Grenzen konstante Fermentaktivität die Größe des Umsatzes bestimmt. Dieses weitgehend passive Verhalten spricht dagegen, daß die Aktivität der Peroxydase von vornherein am Zustandekommen des Befallsbildes maßgeblich beteiligt ist.

Die Bestimmungen des Ascorbinsäuren- und Polyphenolgehaltes brachten Befunde, die zu der Schlußfolgerung verleiten könnten, daß zwischen dem Gehalt an diesen Substanzen und dem Rostbefallsbilde keine ursächlichen Beziehungen beständen. Denn während der hoch braunrostresistente *T. monococcum* stets erheblich mehr Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure und phenolische Körper aufwies als der hoch anfällige Michigan Amber, zeigte sich in dem Belichtungsversuch mit Brevit und dem Jodessigsäureversuch mit Strubes Dickkopf gerade umgekehrt bei den Pflanzen ein höherer Gehalt an diesen Substanzen, denen eine größere Befallseignung zukommt. Allerdings waren die Unterschiede bei Strubes Dickkopf, wie bereits erwähnt, sehr wenig ausgeprägt. Wir sind also wohl berechtigt, unsere Diskussion auf die im Sortenversuch und die im Belichtungsversuch mit Brevit erzielten Ergebnisse zu beschränken. Hier sprechen nun die durchaus gegensätzlichen Befunde anscheinend dafür, daß die Ascorbinsäuren bzw. Phenole in keinem direkten Zusammenhang mit der B e f a l l s i n t e n s i t ä t zu stehen brauchen. Die Ergebnisse schließen aber anderseits

nicht aus, daß der Gehalt an diesen Substanzen für die Ausprägung des Infektions t y p u s Bedeutung haben könnte.

Zur Erläuterung dieser Ansicht sei zunächst auf eine Aussage von ZIMMERMANN (59) verwiesen, die sich in seinem wertvollen Sammelreferat über die Beziehungen zwischen Parasit und Wirtspflanze aus dem Jahre 1925 findet: „Besonders möchte ich aber an dieser Stelle noch darauf hinweisen, daß der Infektionsgrad und der Infektionstypus von ganz verschiedenen Faktoren abhängen können und daß somit bei der gleichen Kombination von Wirtspflanze und Parasit eine sehr hoher Infektionsgrad, aber ein starke Resistenz anzeigender Infektionstypus gefunden werden kann" (S. 354 u. a. O.). Es sei ferner daran erinnert, daß Brevit zu jenen Sorten gehört, die in Kombination mit bestimmten Braunrostrassen bei Lichtmangel eine auffallende Veränderung des normalerweise resistenten Infektionstypus nach der anfälligen Seite aufweisen können (HASSEBRAUK, 24, 25). In den früheren ausführlichen Untersuchungen des ersten der beiden Verfasser trat dies allerdings in stärkster Form erst bei einer Reduzierung des Lichtgenusses auf täglich drei Stunden in Erscheinung. Es ist nun wichtig und in der zitierten Arbeit (24) ausdrücklich hervorgehoben, daß Hand in Hand mit dieser Erhöhung des Infektionstypus eine deutliche Minderung der Befallsstärke ging, ein Umstand, der seinerzeit Veranlassung gab, erneut und mit Nachdruck auf den von ZIMMERMANN bereits erwähnten Dualismus Infektionstypus-Befallsgrad hinzuweisen (vgl. auch HART und FORBES, 22; WEI, 57; u. a.).

In unseren Versuchen mit Brevit haben wir zunächst nur mit einer Minderung der Belichtung auf täglich sechs Stunden gearbeitet; die vorgesehenen weiter gestaffelten Untersuchungen konnten aus der eingangs erwähnten, erzwungenen Unterbrechung unserer Arbeiten noch nicht durchgeführt werden. Bei dieser Lichtminderung verhielt sich der Kohlenhydratstoffwechsel von Brevit so, wie vorauszusehen war, und wie er sich wohl bei der Mehrzahl aller Sorten verhalten würde: Minderung der Zuckerreserven infolge verringerter Photosynthese und gleichzeitig verstärkter Atmung. Erwartungsgemäß wird dadurch die Befallsstärke wegen geringerer „Eignung" des Substrats für die Fruktifikation des Rostpilzes herabgesetzt. Das dürfte grundsätzlich für jede Rostart und -rasse gelten, wobei allerdings unterschiedliche Optima denkbar wären, hat aber mit der unabhängig davon verlaufenden Resistenzbeeinflussung in speziellen Fällen nichts zu tun. Wenn aber bei derselben Sorte der Ascorbinsäuren- und Polyphenolgehalt durch den Lichtentzug gleichfalls gemindert wird und sich dem Bilde des hochanfälligen Michigan Amber nähert, so läßt das vermuten, daß eine irgendwie geartete Beziehung dieser Substanzen zu den eigentlichen Resistenzvorgängen besteht, die sich im Infektionstypus manifestieren. Eine Nachprüfung dieser Hypothese an dem fraglichen Erscheinungsbilde, wie es uns im Jodessigsäureversuch entgegentrat, wird auf Schwierigkeiten stoßen, da die Verabfolgung von Jodessigsäure auch schon ohne Infektion zum Auftreten von Chlorosen führt.

Zusammenhänge von Phenolen oder Ascorbinsäure mit dem Resistenzgeschehen sind schon wiederholt vermutet worden, und es liegt auch eine ganze Anzahl von einschlägigen Untersuchungen vor (vgl. u. a. für Phenole: DUFRÉNOY, 14; KARGAPOLOVA, 34, 35; NEWTON und ANDERSON, 43; POLITIS, 47. Für Ascorbinsäure: PILGRIM und FUTRELL, 45). Von besonderem Interesse sind im Hinblick auf unsere Befunde die Untersuchungen von KARGAPOLOVA, die auch mit *T. monococcum* gearbeitet und hier wie bei dem gleichfalls hoch braunrostresistenten *T. timopheevi* einen gegenüber anfälligen Sorten unverhältnismäßig hohen Gehalt an Protokatechuphenolen im Zellsaft festgestellt hat. Die Zusammenhänge mit Resistenzerscheinungen werden um so wahrscheinlicher, nachdem von ATKINSON und SHAW (2) beim Gerstenmehltau ein der Blockierung durch zelleigene phenolische Körper ausgesetztes Ektoferment nachgewiesen worden ist. Wenn in manchen Fällen solche Zusammenhänge nicht zu bestehen scheinen, so darf ja nicht übersehen werden, daß auch bei diesem Problem wieder die quantitative Seite in Betracht gezogen werden muß, und daß die Toleranz sehr verschieden sein kann. Auch die negativen Befunde von FUCHS und ROHRINGER (16) brauchen nicht gegen derartige Zusammenhänge zu sprechen. Diese Autoren haben mit zwei Weizensorten gearbeitet, die zwar unterschiedliches Verhalten gegenüber bestimmten Schwarzrost r a s s e n , aber keine extremen Unterschiede im Resistenzverhalten gegenüber der ganzen Rost a r t aufwiesen. Vor allem haben unsere Untersuchungen gezeigt, daß quantitativ einwandfrei nachweisbare Unterschiede im Polyphenolgehalt im Papierchromatogramm nicht in Erscheinung zu treten brauchen.

Auf Grund unserer früheren und jetzigen Beobachtungen erscheint es am aussichtsreichsten, künftig Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung und weitgehender Variierung des Lichtfaktors an Sorten durchzuführen, die erfahrungsgemäß auf Lichtentzug mit einer zunehmenden Abschwächung der Resistenzerscheinungen gegen Rostpilze reagieren können und damit im Gegensatz zu der Mehrzahl aller Sorten stehen. Außer Brevit kennen wir heute eine ganze Anzahl von Weizensorten, die in diese Kategorie gehören (siehe Angaben bei HASSEBRAUK, 24). Neuere unveröffentlichte Untersuchungen des ersten der beiden Verfasser haben gezeigt, daß nach der Infektion mit bestimmten Braunrostrassen auf einigen im Licht mit dem Infektionstypus O ohne die geringste Fruktifikation reagierenden Sorten eine mäßige Fruktifikation zu erzielen ist, wenn man die Blätter abschneidet und unter gleichzeitiger Glukosezufuhr absolut dunkel hält. Bei entsprechender Versuchsanstellung machte BROWNING (9) ähnliche Beobachtungen an manchen Hafersorten nach der Infektion mit *Puccinia graminis* und *P. coronata*. Es sei in diesem Zusammenhang auch auf die gleichsinnige Erscheinung einer erhöhten Resistenz bei stärkerer Belichtung hingewiesen (BEVER, 3; JONES, 33; FUTRELL und RIVERS, 17; u. a.). Inwieweit der eine oder andere Fall von Feldresistenz bei Jugendanfälligkeit gleichfalls in diesen Bereich gehört, bedürfte im einzelnen der Nachprüfung unter kontrollierten Bedingungen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß bei dieser wiederholt beobachteten eigentümlichen Rolle des Lichtfaktors für die Ausprägung des Be-

fallsbildes lichtempfindliche Substanzen beteiligt sind. Unter Umständen wäre zum Beispiel auch an die Folsäure zu denken, deren bedeutsame Rolle für die Rostentwicklung experimentell nachgewiesen werden konnte (Hassebrauk, 26; Hotson, 28). Es sei mit diesem Hinweis abschließend nochmals hervorgehoben, daß wir mit der Wechselwirkung mehrerer Stoffwechselvorgänge bei der Manifestierung des Infektionstypus wie der Befallsintensität rechnen.

Zusammenfassung

Um das Verhalten von Weizenkeimpflanzen gegenüber *Puccinia triticina* physiologisch zu charakterisieren, wurden einige zur Endoxydation gehörende Fermentsysteme im Quetschsaft der unbeimpften Wirtspflanzen getestet. Dem gleichen Ziel diente die papierchromatographische Trennung der Zucker und Säuren.

Die Untersuchungen wurden vergleichend durchgeführt an:

1. der extrem rostanfälligen Sorte Michigan Amber und dem gegen Braun- und Gelbrost sehr resistenten *Triticum monococcum* var. *hornemanni.*

2. normal belichteten und nur sechs Stunden täglich belichteten Pflanzen der Sorte Brevit, bei der Lichtentzug zu einer Minderung der Braunrostresistenz wie gleicherweise der Befallsstärke führen kann.

3. unbehandelten und mit Jodessigsäure behandelten Pflanzen der Sorte Strubes Dickkopf; JES-Zufuhr bedingt Wuchshemmungen und Chlorosen, erhöht aber gleichzeitig die Befallsstärke auf der an sich schon anfälligen Sorte.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Die Aktivität des Cytochromsystems war bei Weizenkeimpflanzen, verglichen mit der Aktivität des Ascorbinsäureoxydasesystems, außerordentlich gering. Polyphenolase ist offenbar nicht vorhanden. Die Ascorbinsäureoxydase scheint die Oxydase der Endoxydation zu sein.

Im Cytochrom- wie im Ascorbinsäureoxydasesystem lagen die Aktivitäten bei denjenigen Pflanzen höher, die eine verminderte bzw. nicht noch erhöhte Eignung für den Braunrostbefall aufwiesen.

Die festgestellte Labilität der Peroxydase läßt keine Aussage zu.

Die als Reservestoffe des Zwischenstoffwechsels dienenden Zucker fanden sich in allen braunrostanfälligeren Pflanzen angereichert, die Säuren des Zwischenstoffwechsels waren bei allen Versuchspflanzen in ungefähr gleicher Menge enthalten. Frühere entsprechende Untersuchungen an der gegen viele Gelbrostrassen resistenten, aber sonst rostanfälligen Sorte Chinese 166 hatten im Vergleich mit Michigan Amber gegenteilige Ergebnisse gebracht.

Die Aktivitätsbestimmungen der Fermentsysteme und die papierchromatographischen Untersuchungen der Zucker und Säuren sprechen für einen

schnelleren Stoffwechsel bei Pflanzen, die zu geringerem Braunrostbefall neigen.

Substanzen mit Schlüsselstellungen in den Endoxydationszyklen wie Ascorbinsäure und verschiedene Phenole sind in dem resistenten *Triticum monococcum* in wesentlich größerer Menge enthalten als in dem hochanfälligen Michigan Amber. Ihr Gehalt nimmt bei Brevit mit Lichtentzug ab. Nach Verabfolgung von JES ist bei Strubes Dickkopf in geringem Ausmaß eine Zunahme festzustellen. Da Brevit vielfach bei Lichtentzug eine Minderung der Braunrostresistenz bei gleichzeitiger Schwächung der Befallsintensität erkennen läßt, liefern unsere Ergebnisse möglicherweise eine Erklärung für die Erscheinung, daß Resistenztypus und Befallstärke zwei Komponenten des Befallsbildes sind, die von verschiedenen Stoffwechselprozessen gesteuert werden können. Für die Befallstärke ist u. a. der Gehalt der Wirtspflanze an Zuckern bestimmend; an der Ausprägung des Infektionstypus ist wahrscheinlich der Gehalt an Ascorbinsäuren und Phenolen in der Wirtspflanze beteiligt.

Literaturverzeichnis

1. ALBAUM, H. G., and B. EICHEL, 1943: The relationship between growth and metabolism in the oat seedling. Amer. J. Bot. **30**, 18—22.
2. ATKINSON, T. G., and M. SHAW, 1955: Occurrence of acid phosphatase in association with the haustoria of powdery mildew on barley. Nature **175**, 993—994.
3. BEVER, W. M., 1934: Effect of light on the development of the uredial stages of *Puccinia glumarum*. Phytopathology **24**, 507—516.
4. BONNER, J., 1948: Biochemical mechanism in the respiration of the avena coleoptile. Arch. Biochem. **17**, 311—326.
5. BROMFIELD, K. R., and C. E. PEET, 1954: Chemical modification of rust reaction of seedling wheat plants infected with *Puccinia graminis tritici*. Phytopathology **44**, 483 (Abstr.).
6. BROWN, A. H., and D. R. GODDARD, 1941: Cytochrome oxidase in wheat embryos. Amer. J. Bot. **28**, 319—329.
7. BROWN, W., 1934: Mechanism of disease resistance in plants. Trans. Mycol. Soc. **19**, 11—33.
8. — —, 1936: The physiology of host-parasite relations. Bot. Ev. **2**, 236—281.
9. BROWNING, J. A., 1954: Breakdown of rust resistance in detached leaves of normally resistant oat varieties. Phytopathology **44**, 483 (Abstr.).
10. CAMBER, B., 1955: Estimation of phenolic substances: Use of stabilized p-aminodiethylanilin. Nature **175**, 1085.
11. CHESTER, K. S., 1933: The problem of acquired physiological immunity in plants. Quart. Rev. Biol. **8**, 129—154 u. 275—324.
12. — —, 1946: The nature and prevention of cereal rusts. Waltham.
13. DALY, J. M., 1949: The influence of nitrogen source on the development of stem rust of wheat. Phytopathology **39**, 386—394.
14. DUFRÉNOY, J., 1936: Rôle des amino-acides et des composés phénoliques dans la susceptibilité ou la résistance des plantes aux maladies. 3. Congr. Pathol. comp. Athen, I., Sect. Path. veget. 16—38.
15. FARKAS, G. L., and Z. KIRÁLY, 1955: Studies on the respiration of wheat infected with stem rust and powdery mildew. Physiol. Plant. **8**, 877.

16. Fuchs, W. H., und R. Rohringer, 1955: Biochemische Veränderungen im Weizenblatt durch Infektion mit *Puccinia graminis tritici*. Naturwissenschaften **42**, 20.
17. Futrell, M. C., and G. W. Rivers, 1955: The effect of temperature on the response of oats to race 216 of crown rust. Plant Dis. Rept. **39**, 853—858.
18. Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. Basel.
19. Gassner, G., und K. Hassebrauk, 1938: Untersuchungen über den Einfluß von Äther- und Chloroformnarkose auf das Rostverhalten junger Getreidepflanzen. Ein Beitrag zum Resistenzproblem. Phytopath. Z. **11**, 47—97.
20. Goddard, D. R., 1944: Cytochrome c and cytochrome oxidase from wheat germ. Amer. J. Bot. **31**, 270—276.
21. Hart, Helen, 1949: Nature and variability of disease resistance in plants. Ann. Rev. Microbiol. III, Stanford, 289—316.
22. — —, and I. L. Forbes, 1935: The effect of light on the initiation of rust infection. Phytopathology **25**, 715—725.
23. Haskins, F. A., 1955: Changes in the activities of several enzymes during germination and seedling development in corn (*Zea Mays* L.). Plant Physiol. **30**, 74—78.
24. Hassebrauk, K., 1939: Untersuchungen über den Einfluß einiger Außenfaktoren auf das Anfälligkeitsverhalten der Standardsorten gegenüber verschiedenen physiologischen Rassen des Weizenbraunrostes. Phytopath. Z. **12**, 233—276.
25. — —, 1940: Zur Frage der Wirkung von Außenfaktoren auf verschiedene Stadien von Weizenbraunrostinfektionen. Ibid. **12**, 490—508.
26. — —, 1952: Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste. III. Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Sulfonamiden und Sulfonen. Ibid. **19**, 56—78.
27. — —, und R. Kaul, 1956: Vergleichende Untersuchungen über die Säuren und Zucker des Grundstoffwechsels an Weizensorten unterschiedlicher Rostanfälligkeit. Naturwissenschaften **43**, 40.
28. Hotson, H. H., 1952: The inhibition of wheat stem rust by sulfadiazine and the reversal of this effect by para-aminobenzoic acid and folic acid. Phytopathology **42**, 11 (Abstr.).
29. Humphrey, H. B., and J. Dufrénoy, 1944: Host-parasite relationship between the oat plant (*Avena* spp.) and crown rust (*Puccinia coronata*). Ibid. **34**, 21—40.
30. James, W. O., 1953: Plant respiration. Oxford.
31. — —, and D. Boulter, 1955: Further studies of the terminal oxidases in the embryos of young roots of barley. New Phytol. **54**, 1.
32. Jones, A. R., E. J. Dowling and W. J. Skraba, 1953: Identification of some organic acids by paper chromatography. Anal. Chem. **25**, 394.
33. Jones, G. L., 1953: Inheritance of the mode of reaction to stem rust, particularly race 15 B, and leaf rust in two crosses of vulgare wheats. Diss. Abstr. **13**, 156—157.
34. Kargapolova, N. N., 1937: Phenolic compounds in wheats in relationship to their resistance to *Puccinia triticina*. Summ. Sci. Res. Wk. Inst. Plant. Prot. Leningrad 1936, 491—492 (nach Rev. Appl. Mycol. **16**, 26).
35. — —, 1937: Chemical pecularities of different species of wheat in relation to their resistance to *Puccinia triticina* Erikss. Bull. appl. Bot. II, **11**, 179—199.
36. Kaul, R., 1957: Ein Schnellverfahren zur quantitativen Bestimmung der Peroxydaseaktivität in Pflanzenpreßsäften. Planta **48**, 622—626.
37. Király, Z., und G. L. Farkas, 1955: Über die parasitogen induzierte Atmungssteigerung beim Weizen. Naturwissenschaften **42**, 213.
38. — —, und — —, 1956: Untersuchungen über den Mechanismus der Endoxydation des rostbefallenen Weizens. Agrokem. Talajtan **5**, 233—240 (Ungar. m. deutsch. Zus.).
39. Livingston, J. E., 1953: The control of leaf and stem rust of wheat with chemotherapeutants. Phytopathology **43**, 496—499.

40. Lundegårdh, H., 1952: Properties of the cytochrome system of wheat roots. Arkiv Kemi **5**, 97.
41. Mains, E. B., 1917: The relation of some rusts to the physiology of their hosts. Amer. J. Bot. **4**, 179—220.
42. Merry, J., and D. R. Goddard, 1941: A respiratory study of barley grain and seedlings. Proc. Rochester Acad. Sci. **8**, 28—44.
43. Newton, R., and J. A. Anderson, 1929: Studies on the nature of rust resistance in wheat. IV. Phenolic compounds of the wheat plants. Canad. J. Res., C, **1**, 86—99.
44. Paech, K., und M. V. Tracey, 1955: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin—Göttingen—Heidelberg.
45. Pilgrim, A., and M. C. Futrell, 1954: Ascorbic acid content of stem rust resistant and susceptible wheats. Phytopathology **44**, 502 (Abstr.).
46. Pohjakallio, O., 1932: Bedeutung verschiedener Zucker als Nährstoffe für einige Roste. Suom. Maataloust. Seuran Julkaisuja **25**, 1—94.
47. Politis, J., 1940: Immunité et hérédité chez les végétaux. Act. Inst. Bot. Univ. Athènes **1**, 1—14.
48. Roemer, Th., W. H. Fuchs und K. Isenbeck, 1938: Die Züchtung resistenter Rassen der Kulturpflanzen. Berlin.
49. Rubin, B. A., und E. W. Arzichowskaja, 1955: Biochemische Charakteristik der Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber Mikroorganismen. Berlin.
50. Sayed, G. S., C. W. Boothroyd and H. L. Everett, 1955: The role of chlorophyll in obligate parasitism. Phytopathology **45**, 186 (Abstr.).
51. Schropp, W., 1951: Der Vegetationsversuch. 1. Teil (Methodenbuch). Radebeul und Berlin.
52. Sempio, C., 1950: Metabolic resistance to plant diseases. Phytopathology **40**, 799—819.
53. Straus, W., 1954: Colorimetric microdetermination of cytochrome c oxidase. J. biol. Chem. **207**, 733.
54. Thatcher, F. S., 1943: Cellular changes in relation to rust resistance. Canad. J. Res., C, **21**, 151—172.
55. Walker, J. C., and M. A. Stahmann, 1955: Chemical nature of disease resistance in plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. **6**, 351—366.
56. Waygood, E. R., 1950: Physiological and biochemical studies in plant metabolism. II. Respiration enzymes in wheat. Canad. J. Res., C, **28**, 7—62.
57. Wei, C. T., 1937: Rust resistance in the Garden Bean. Phytopathology **27**, 1090—1105.
58. Wu, Y. S., 1952: Production of stem rust sori on albino barley. Ibid. **42**, 177—178.
59. Zimmermann, A., 1925: Sammelreferate über die Beziehungen zwischen Parasit und Wirtspflanze (Uredineen). Cbl. Bakt. II. **65**, 312—468.

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Obstbau, Heidelberg

Phomopsis mali ROBERTS als Erreger von Rindenschäden an Pflaumenbäumen

Von

A. SCHMIDLE

Mit 7 Abbildungen

A. Einleitung

Für die Lebensdauer und Leistung des Obstbaumes ist die Gesunderhaltung seines Gerüstes (Stamm, Äste und Zweige) von einer entscheidenden Bedeutung, denn mit Blattschäden verglichen rufen Rindenschäden viel tiefer greifende und nachhaltigere Veränderungen hervor. Aus diesem Grunde wird am hiesigen Institut seit einiger Zeit den Pilzen, die Rindenschäden an Obstgehölzen verursachen, besondere Aufmerksamkeit zugewendet. Im Rahmen dieser Arbeiten habe ich kürzlich über Infektionsversuche mit *Phytophthora cactorum* an Apfelbäumen berichtet (SCHMIDLE, 1957). Die vorliegende Untersuchung befaßt sich mit *Phomopsis mali* ROBERTS, die als Erreger stärkerer Zweigschäden in einer Pflaumenanlage festgestellt wurde. Die Anlage ist etwa 15 Jahre alt und befindet sich im Raume von Trier, wo dem Steinobstbau eine gewisse Bedeutung zukommt. Auch in anderen Steinobstpflanzungen sind die gleichen Schadbilder verbreitet.

Im Ausland ist der Pilz als Ursache von „die-back", „dead-arm", „rough-bark" und „constriction-disease" an Kern- und Steinobst bekannt (SMITH, 1916; MARCHAL, 1921, 1933; CAYLAY, 1923; CHUPP und CLAPP, 1923; BRITON-JONES, 1925; ROBERTS, 1934, 1940; GOVI, 1951; WEAVER, 1951). Außer Rindenschäden wird eine Fruchtfäule durch ihn hervorgerufen (MARCHAL, 1921; BRITON-JONES, 1925; KIDD und BEAUMONT, 1924; BARTHELET, 1943). Die Beurteilung seiner Pathogenität ist nicht einheitlich. Verschiedene Autoren bezeichnen ihn als Saprophyten, andere als Wundparasiten. In Deutschland hat man den Pilz als Schaderreger an Obstgehölzen bisher offenbar übersehen; erst neuerdings ist man auf ihn aufmerksam geworden. Der erste Bericht, und zwar über Schäden durch *Phomopsis mali* in einer Apfel-Junganlage, erschien von BAUMEISTER (1956). Der von mir erwähnte Schadfall wurde zum Anlaß genommen, den Pilz näher zu untersuchen und durch künstliche Infektionen über seine Pathogenität Klarheit zu schaffen.

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit erschien eine Veröffentlichung von KRÖBER (1956), die sich mit *Phomopsis*-Arten an Apfel-, Birn-, Pflaumen-, Reneclauden- und Mirabellenbäumen sowie an Stachelbeerbüschen befaßt. Das von KRÖBER mitgeteilte Krankheitsbild weicht jedoch erheblich von dem nachstehend beschriebenen ab.

B. Schadbild und Krankheitsverlauf

Auf den Zweigen sind 0,5 bis 10 cm lange Rindennekrosen („Rindenschilder") vorhanden (Abb. 1 a, b, c, 2). Sie umfassen tangential die Zweige meist bis zur Hälfte. Dünnere Zweige, besonders die Zweigspitzen, sind oft ganz „umgürtet", so daß die über den Nekrosen befindlichen Teile abgestorben sind. Bei einigen Pflaumensorten sind die Zweige geradezu übersät mit solchen „Rindenschildern". Die Knospen und Kurztriebe, die in der Mitte der Rindennekrosen liegen, sind meist auch abgestorben, so daß der Austrieb unterblieb. Dadurch sind Zweigabschnitte, ja sogar ganze Äste, verkahlt (Abb. 3).

Abb. 1.
a) Abgestorbene Rinde um Knospe und Blattbasis.
b) „Rindenschild" um Knospe und Blattbasis. Beginnender Gummifluß.
c) Oben: kleineres „Rindenschild", unten: Rinde der Nekrose aufgerissen

Die nähere Untersuchung ergab nun, daß die ersten Anzeichen der Schäden sich im Frühjahr als braune Verfärbungen auf der Rinde bemerkbar machen. Nachdem das Triebwachstum begonnen hat, erscheinen diese Stellen gegenüber der sie umgebenden gesunden Rinde eingesunken, und mit dem weiteren Wachstum der Zweige zeichnen sie sich als deutliche „Rindenschilder" (Abb. 1 a, b, c, 2) ab. Fast immer liegen diese „Schilder" um Blattnarben und Knospen und auch an der Basis von Kurztrieben, seltener von Seitenzweigen. Im Laufe des Sommers reißt die Rinde auf, so daß das Holz sichtbar wird (Abb. 4 a). Oft tritt an diesen Rindenstellen, vor allem im Anfangsstadium, Gummifluß auf (Abb. 1 b).

Das unter den Rindennekrosen befindliche Holz ist einseitig braun bis braunschwarz verfärbt, ebenso gilt das für Teile vom Mark. Die Holzver-

Abb. 2. „Rindenschild" an der Basis eines abgestorbenen Kurztriebes

Abb. 3. Verkahlter Zweig mit Rindennekrosen

Abb. 4 (rechts).
a) Rinde aufgerissen und teilweise abgefallen. Beginnende Überwallung.
b) Pykniden von *Phomopsis mali* auf einem Pflaumenzweig

a b

färbungen ziehen sich noch einige Millimeter unter der gesunden grünen Rinde hin. Da das Kambium unter der Rindennekrose abgestorben ist, kann hier kein Holzzuwachs mehr erfolgen. Durch den einseitigen Holzzuwachs erhalten die Zweige ein gequetschtes und abgeflachtes Aussehen.

Am Zweigquerschnitt ist zu erkennen, daß der Schaden einsetzte, als die Jahresringbildung bereits abgeschlossen war. Die Nekrose hat nicht auf das im nächsten Jahr gebildete Holz übergegriffen. Nach den bisherigen Feststellungen sind diese Rindennekrosen immer „einjährig", d. h. soweit die

Zweige nicht umfaßt werden, beginnt in der nächsten Vegetationsperiode die Umwallung mit dem von den Wundrändern her gebildeten Gewebe und damit der Heilprozeß. Wir haben es folglich nicht mit einem „Baumkrebs" zu tun, der von Jahr zu Jahr weiter um sich greift, sondern mit einem typischen „Rindenbrand" (APPEL und WESTERDIJK, 1919; ZYCHA, 1955). Nur dort, wo das Holz sehr dünn ist oder wo viele „Rindenschilder" auftreten, sterben die Zweige ab, wodurch das im Ausland als „die-back" bezeichnete Schadbild entsteht.

Wie bereits angedeutet, variiert das Ausmaß der Schäden in Abhängigkeit von der Pflaumensorte. So war Ontario besonders stark befallen, es folgten Gerstetter, Kirkes Pflaume, Gute von Bry und Wangenheims. Zimmers Frühzwetsche und die Nancy Mirabelle wiesen schwächere Schäden auf, Bühlers Frühzwetsche war kaum betroffen.

C. Krankheitserreger

Auf einem Teil der abgestorbenen Rindenpartien wurden im Frühjahr und Sommer Pykniden von *Phomopsis mali* ROBERTS festgestellt (Abb. 4 b). Die mikroskopische Untersuchung der Nekrosen ergab, daß Holz und Mark stark von zelligem Myzel durchwachsen sind. Um den oder die Erreger zu ermitteln, wurden Abimpfungen mittels kleiner Rinden- oder Holzstückchen aus der erkrankten Rinde und von ihrem Rande entnommen. Zahlenmäßig verteilen sich die Ergebnisse der Abimpfungen auf Bakterien und Pilze, wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist. Rund 60 % der isolierten Organismen gehörten zu *Phomopsis mali* ROBERTS. Daneben fanden sich vereinzelt *Cytospora* sp., *Fusarium* sp. und *Alternaria* sp.; die übrigen Pilze konnten bisher noch nicht bestimmt werden. Im Herbst 1955 mit den Bakterien durchgeführte Infektionsversuche blieben erfolglos, so daß sie als Krankheitserreger vorläufig ausgeschlossen wurden und zunächst keine weitere Beachtung fanden. Dagegen hatten die Infektionsversuche mit *Phomopsis mali* positive Ergebnisse. Dieser Pilz dürfte daher die unmittelbare Ursache für die Rindennekrosen und das „die-back" sein.

Tabelle 1

Ergebnis der Abimpfungen von den Rindennekrosen

Abgeimpfte Organismen	Anzahl	davon *Phomopsis mali*
Pilze	161	144
Pilze und Bakterien	25	
Bakterien	16	
Keine Organismen	60	

D. Morphologie und Taxonomie des Krankheitserregers

Der Pilz hat 370 bis 490 × 600 bis 1000 μ große, zuerst linsenförmige, später kegel- bis kugelförmige schwarze Pykniden mit einer dicken Peridie.

Die Pykniden sind meist einkammerig — unvollständige Kammerung kommt vor — und mit einer Mündung versehen; sie werden in der Rinde der Zweige gebildet, die sie dann später durchbrechen. Jedes Pyknidium führt zwei Sporenarten: 1: 7,9 × 2,6 μ (6,4 bis 10 × 2,2 bis 3 μ) große, hyaline, spindelähnliche Sporen mit spitzen oder auch schwach abgerundeten Enden, die zwei ölähnliche Tropfen enthalten und die als A-Sporen anzusehen sind; 2: 27,2 × 1,2 μ (20 bis 34 × 1 bis 1,5 μ) große, hyaline, fadenförmige, an einem Ende oft gebogene oder hakenförmige, sogenannte B-Sporen. Die Sporophoren der A-Sporen messen 15 bis 17 μ.

In Reinkultur wächst der Pilz auf den üblichen Nährböden gut. Auf Haferagar bildet er ein weißes, faseriges bis filziges Myzel. Nach etwa acht Tagen beginnt im Substrat die Pyknidenbildung. Auf Haferagar und einem Bouillonagar ist das Myzel zoniert. Die Pykniden zeigen sich auf der Agaroberfläche als grauschwarze, oft behaarte Pusteln. Später entlassen sie, offenbar in Abhängigkeit vom Feuchtigkeitsgehalt der Umgebung, mehr oder weniger lange Sporenranken, die zunächst weißlich aussehen und später eine gelbe Farbe annehmen. Diese Sporenranken enthalten wiederum A- und B-Sporen. Bei älteren Kulturen wird das Myzel olivfarben, und es bilden sich schwärzliche, pseudosklerotiale Zonen. Perithezien des Pilzes konnten bisher weder auf den erkrankten Zweigen, noch in den Reinkulturen gefunden werden.

Da der Pilz in der Literatur mehrere Namen erhalten hat, wird ein Überblick über seine verschiedenen Bezeichnungen gegeben. Der Pilz wurde von Oudemans 1886 wahrscheinlich zum erstenmal als *Fusicoccum malorum* beschrieben. 1921 konnten Él. und Ém. Marchal nachweisen, daß *Fusicoccum malorum* Oud. die Nebenfruchtform einer *Diaporthe* ist, die sie *Diaporthe perniciosa* nannten. Der von ihnen untersuchte Pilz verursachte Zweigschäden an Apfel-, Birn-, Pflaumen- und Kirschbäumen. In einer späteren Arbeit über die Ursache des „die-back" von Pflaumenbäumen stellte Caylay (1923) eine *Phomopsis*-Art fest. Als zugehörige Hauptfruchtform fand auch sie eine *Diaporthe*. Da dieser Pilz in seinen morphologischen Merkmalen der von Marchal (1921) beschriebenen *Diaporthe perniciosa* glich, gab sie ihm den Namen *Diaporthe perniciosa* March. forma *pruni*, soweit der Pilz aus der Rinde von Pfirsich- und Pflaumenbäumen isoliert wurde. Marchal konnte an Hand einer eingesandten Probe die Übereinstimmung der beiden Pilze bestätigen. Die vorhandenen geringen Unterschiede sah er als eine Variation an, die in den üblichen Grenzen liegt. Roberts (1912) hatte schon früher eine *Phomopsis* mit A- und B-Sporen beschrieben, die bei Apfelzweigen einen „canker" hervorrief, und der er den Namen *Phomopsis mali* gab. Ob die von Allescher (1901) genannte *Phoma mali* Schulz et Sacc. damit übereinstimmt, sei dahingestellt (Lindau, 1922). Kidd und Beaumont (1924) konnten durch ihre Untersuchungen zeigen, daß es sich bei dem von Marchal (1921) beschriebenen Pilz nicht um ein *Fusicoccum*, sondern um eine *Phomopsis* gehandelt hat. Sie wiesen nach, daß *Phomopsis mali* Roberts, ebenso das Pyknidenstadium von *Diaporthe perniciosa* — das Marchal als *Fusicoccum malorum* Oud. bestimmte — und das Pyknidenstadium von *Diaporthe perniciosa* March. forma *pruni* Caylay identisch sind. Sie sind der Meinung, daß der Name *Phomopsis perniciosa* forma *pruni* dem früheren Namen *Phomopsis mali* Roberts weichen muß. Auch das von Chupp und Clapp (1923) beschriebene *Fusicoccum pyrorum* wird von ihnen identisch mit *Phomopsis mali* Roberts angesehen. Ebenso bezeichnen Laubert und Richter (1932) *Fusicoccum pyrorum* Chupp et Clapp als Synonym von *Phomopsis mali* Roberts. 1940 beschrieb Roberts eine „constriction-disease" an Pfirsichen, als deren Ursache er einen Pilz ermittelte, den er mit der von ihm 1912 beschriebenen *Phomopsis mali* identisch hielt. Später (1942) fand er auch die zugehörige Hauptfruchtform *Diaporthe perniciosa* March.

Erwähnt sei noch, daß WEHMEYER (1933) *Diaporthe perniciosa* MARCH. unter *Diaporthe eres* NIT. stellt. Er glaubt, daß viele kleine Varietäten des Pilzes bestehen, welche auf bestimmte Wirte begrenzt sind, und daß ein „Irrgarten" (Maze) von Übergangsformen existiert, so daß es schwierig sei, eine Abgrenzung dieser Formen auf morphologischer Basis vorzunehmen.

Auf Grund der in der Literatur befindlichen Angaben halte ich den von mir isolierten Pilz für identisch mit der von ROBERTS (1912, 1940), MARCHAL (1921), CAYLAY (1923), CHUPP und CLAPP (1923) und KIDD und BEAUMONT (1925) beschriebenen *Phomopsis mali*, der Pyknidenform von *Diaporthe perniciosa*.

E. Infektionsversuche

Um ein Bild über den Krankheitsverlauf und die Bedingungen für das Auftreten zu bekommen, wurden die allgemeinen Beobachtungen durch Infektionsversuche ergänzt.

1. Methodik

Die Infektionsversuche führte ich an Zweigen 14jähriger Pflaumenbäume der Sorte Ontario durch, und zwar an „diesjährigen" Langtrieben und an älteren Zweigen. Als Infektionsmaterial dienten Sporen und Myzel von vier Stämmen der *Phomopsis mali*. Die Infektionsmethode blieb im wesentlichen dieselbe wie in früheren Arbeiten (SCHMIDLE, 1953, 1956). Für die Sporeninfektionen wurden Sporenranken den Reinkulturen der vier Stämme entnommen, in steriles und dest. Wasser gegeben und durch Schütteln verteilt. Die Myzelstücke bzw. Tropfen der Sporenaufschwemmung wurden dann in 0,5 bis 1 cm lange Rindenlängsschnitte eingeführt. Ein feuchter Verband aus Watte und einer Kunststoffolie verblieb etwa drei bis vier Wochen auf der Impfstelle. Bei den im Herbst durchgeführten Impfungen blieb ein Teil der Impfstellen ohne Verband. Die Kontrollschnitte erhielten den gleichen Verband. Als Kriterium für eine stattgefundene *Phomopsis*-Infektion diente einmal das Entstehen von *Phomopsis*-Pykniden, zum anderen die über die Schnittstelle mindestens 2 cm hinausgehende braune Verfärbung der Rinde und die Reisolierung des Pilzes aus diesem Gewebe. Die Verfärbung trat bei den beimpften Zweigen gegenüber den unbeimpften deutlich hervor. In Zweifelsfällen entschied die Reisolierung über den Infektionserfolg. Sie wurde grundsätzlich durchgeführt, auch bei größeren Nekrosen.

Abb. 5. Querschnitt durch überwallte Impfstelle am Zweig eines 14jährigen Hochstammes der Sorte Ontario.
Impfung: 25. 8. 1955. Aufnahme: 31. 7. 1956

2. Infektionsergebnisse

Die Impfungen mit Sporen und Myzel erfolgten zu nachstehenden Terminen: 25. 8. 1955, 19. 10. 1955 und 30. 4. bzw. 8. 5. 1956. Die Ergebnisse

sind aus Tabelle 2 zu ersehen, die auch weitere Einzelheiten der Versuchsbedingungen enthält. Die Impfungen, die im August vorgenommen wurden, fielen alle negativ aus. Die Überwallung der Wundstellen, die durch den Impfschnitt entstanden, setzte noch in demselben Jahr ein; sie schlossen sich aber erst in der folgenden Vegetationszeit, und zwar bis zum 31. 7. 1956. Das Holz, das durch den Schnitt freigelegt wurde, verfärbte sich braun bis braunschwarz, was später noch im Querschnitt zu sehen war (Abb. 5). Die Impfungen vom 30. 4. 1956 hatten ebenfalls ein negatives Ergebnis. Bis zum 31. 7. 1956 waren hier sämtliche Einschnitte überwallt.

Erfolgreicher waren hingegen die Impfungen, die am 19. 10. 1955, etwa zur Zeit des Blattfalles, durchgeführt wurden. Hier verursachte der Pilz ausgedehnte Rindennekrosen (Abb. 6), die am 25. 4. 1956 eine mittlere Länge von 7 bis 8 cm erreicht hatten; die größte Nekrose war 17 cm lang. Zu

Abb. 6. Durch Impfung mit Sporen von *Phomopsis mali* hervorgerufene Nekrose am Zweig eines 14jährigen Hochstammes der Sorte Ontario.
Impfung: 19. 10. 1955. Aufnahme: 31. 7. 1956

Tabelle 2

Infektionsversuche mit *Phomopsis mali*

Impfdatum	Impfung mit	Alter der Zweige	Anzahl der Impfungen	„positive" Infektionen	Nr.-Schild in Verlust geraten	„positive" Infektionen der Impfungen in %
25. 8. 1955	Myzel	Triebe von 1955	11	0	1	0
		1-jährig und älter	5	0	—	0
	Sporen	Triebe von 1955	9	0	—	0
19. 10. 1955	Myzel	Triebe von 1955	12	11	1	100*)
		1-jährig und älter	8	8	—	100
	Sporen	Triebe von 1955	12	9	3	100*)
		1-jährig und älter	8	6	2	100*)
30. 4. 1956	Myzel	1-jährig	22	0	—	0
8. 5. 1956	Sporen	1-jährig	27	0	—	0

*) bezogen auf die wiedergefundenen Impfstellen.

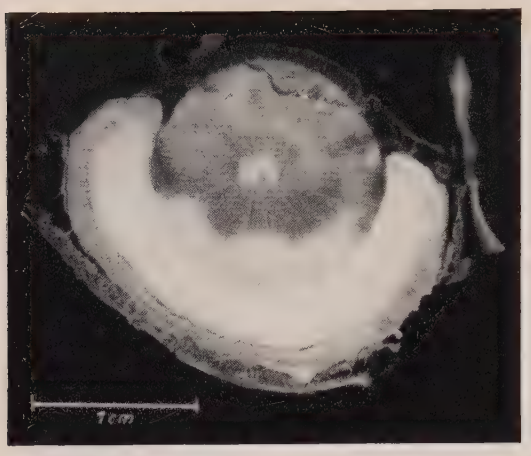


Abb. 7. Querschnitt durch den Zweig von Abb. 6. Die durch den Pilz getötete Rinde liegt dem Holz noch auf. Überwallung hat eingesetzt

einer „Umgürtung" der Zweige (9 von 40) kam es jedoch nur in wenigen Fällen. Bei den nicht „umgürteten" Zweigen setzte im Laufe des Sommers 1956, von den Wundrändern ausgehend, ein kräftiges Überwallungswachstum ein. Der Holzzuwachs erfolgte einseitig, weil das Kambium unter der Rindennekrose zerstört war. Holz und Mark waren ebenfalls teilweise braun verfärbt (Abb. 7). Die Verfärbung des Holzes erstreckte sich noch einige Millimeter unter die gesunde Rinde. Bemerkenswert ist noch, daß die Myzelinfektionen etwas größere Nekrosen verursachten als die Sporeninfektionen. Sämtliche Kontrollen blieben unbefallen. Es kann somit festgestellt werden, daß es dem Pilz nur während der Vegetationsruhe möglich war, in die Rinde einzudringen und Nekrosen zu verursachen.

F. Diskussion der Infektionsergebnisse unter Berücksichtigung der Literatur

Die parasitären Eigenschaften des Pilzes werden nicht einheitlich beurteilt. So sieht BRITON-JONES (1925) *Diaporthe perniciosa* MARCH. als „schwachen Parasiten" an, der nur dann pathogen werden kann, wenn die Bäume durch andere Ursachen geschwächt sind. Diese Ansicht gründet er darauf, daß seine Infektionsversuche mit dem Pilz an Zweigen von Apfel- und Birnbäumen erfolglos blieben. Auch OGLIVIE (1935) berichtet über erfolglose Infektionsversuche mit dem Pilz an Apfelzweigen und bezeichnet ihn als Saprophyten.

CAYLAY (1923) gelangen Infektionen gut an „diesjährigen" Zweigen von Pfirsich-, Pflaumen-, Nektarinen- und Aprikosenbäumen, jedoch nicht an einjährigen Pflaumenzweigen. Die erfolgte Infektion wurde in manchen Fällen, vor allem bei den Pflaumenzweigen, erst nach Monaten sichtbar. Für diese Unterschiede macht CAYLAY Alter und Sukkulenz der infizierten Teile verantwortlich. Sie bezeichnet den Pilz als Wundparasiten.

MARSH und NATRASS (1928) führten Ende August 1926 Infektionsversuche an Pflaumenbäumen der Sorte Czar durch. An einigen von ihnen hatten sie die Rinde mittels eines Messers zwei Fuß über der Erde „geringelt". Fast sämtliche Impfungen, ob an „geringelten" oder „nicht geringelten" Bäumen waren erfolgreich, ohne daß die Bäume starben. Die Nekrosen vergrößerten sich zuerst stark, ab Mitte Oktober trat jedoch ein Stillstand ein. Auf Grund

dieser Versuche sehen Marsh und Natrass den Pilz als Parasiten an, sie vermuten aber, daß es auch nichtparasitäre Stämme gibt. Roberts (1940) gelangen mit dem Pilz ebenfalls Infektionen an Zweigen von Apfel- und Pfirsichbäumen, wobei die verschiedenen Herkünfte jedoch unterschiedlich pathogen waren. Horne und Das Gupta (1930) bestimmten die relative „Angriffskraft" von *Diaporthe-* und *Phomopsis*-Arten gegenüber Bramleys Apfelsämlingen. Sie konnten zeigen, daß *Diaporthe perniciosa* bzw. *Phomopsis mali* aktiver waren als andere Arten derselben Familie. In einer späteren Arbeit (1933) wiesen sie darauf hin, daß die verschiedenen Stämme von *Diaporthe perniciosa* große Unterschiede hinsichtlich ihrer Befallsrate bringen.

Aus meinen Infektionsversuchen geht hervor (Tabelle 2), daß die verwendeten Pilzstämme nur während der Vegetationsruhe der Bäume sich in der Rinde der Zweige ausbreiten konnten, wobei sie begrenzte Nekrosen hervorriefen. In meinen Versuchen wurden während der Vegetationszeit die Impfstellen schnell von den Bäumen überwallt. Im Gegensatz zu Marsh und Natrass (1928) gelangen mir im August keine Infektionen. Ob hierfür die bei *Phomopsis mali* offenbar vorhandenen starken Virulenzunterschiede der verwendeten Stämme verantwortlich zu machen sind (Marsh und Natrass, 1928; Das Gupta, 1933 und Roberts, 1940), muß zunächst offenbleiben. Eine gewisse Rolle mögen ferner klimatische Bedingungen und das in die Versuche einbezogene unterschiedliche Baummaterial sowie andere Umstände spielen. Meine Infektionsversuche verliefen aber positiv, wenn die Impfung in der Zeit der Vegetationsruhe stattfand. Der Erfolg der Infektion ist somit jahreszeitlich bedingt.

Bei der Beschreibung des Krankheitsbildes wurde bereits erwähnt, daß die Nekrosen immer an der Grenze eines Jahresringes abschließen. Daraus ist zu folgern, daß die Zerstörung der Rinde und des Kambiums nur während der Vegetationsruhe vor sich gegangen sein kann. Diese Feststellung deckt sich mit den Ergebnissen meiner Versuche. In beiden Fällen entwickelte sich die Nekrose in der Zeit der Vegetationsruhe.

Der Pilz ist auf Grund der Infektionsversuche als Wundparasit zu bezeichnen, dem es jedoch nur dann gelingt sich in der Rinde auszubreiten, wenn eine bestimmte Disposition des Wirtes — in diesem Falle die Ruheperiode der Pflanze — vorliegt. Während der Vegetationszeit haben die Bäume offensichtlich den Pilzangriff erfolgreich abgewehrt.

Ganz ähnliche Verhältnisse sind von *Phomopsis pseudotsugae* Wilson bekannt, einem Pilz, der an Douglasie und Japanlärche eine „Rindenschildkrankheit" verursacht. So berichtet Zycha (1952) über Infektionsversuche von van Vloten, wobei die stärksten Schäden nach einer Infektion während der Wintermonate auftraten, während sie nach Herbst- und Frühjahrsverletzungen wesentlich geringer und nach Sommerverletzungen überhaupt nicht vorhanden waren. Zycha bezeichnet den Pilz ebenfalls als „einjährig" und weist darauf hin, „daß die Einjährigkeit der Rindenpilze nicht im Pilz selbst ihre Ursache hat, sondern in der Reaktion der Wirtspflanze". Von Bedwell (1937) mit einer nicht näher bestimmten *Phomopsis*-Art an Kastanien durch-

geführte Infektionsversuche brachten ebenfalls die größten Schäden während der Ruhezeit der Bäume. Ähnliche Ergebnisse hatten meine Infektionsversuche mit *Dothichiza populea* SACC. et BRIARD an Pappeln (SCHMIDLE, 1953). Hier wurden die Pilzinfektionen auch nur in der Zeit von September bis März den Pappeln gefährlich. Zu den Infektionsversuchen von KRÖBER (1956) kann in diesem Zusammenhang nicht Stellung genommen werden, da er nicht angibt, in welcher Jahreszeit sie durchgeführt wurden.

Die hohe Widerstandsfähigkeit der Pflanzen in der Vegetationszeit wird von GÄUMANN (1946) als jahreszeitliche oder Saison-Resistenz bezeichnet. Ihre Ursachen, ihre Abhängigkeit vom Wassergehalt der Zweige und von anderen Faktoren sollen im Rahmen dieser Arbeit noch nicht errötert werden.

G. Infektionszeit und Infektionswege des Pilzes

Die Pykniden- und Sporenbildung des Pilzes ist im Frühjahr und Sommer besonders stark. Man könnte deshalb diese Zeit für das Eindringen des Pilzes in die Rinde als besonders günstig ansehen. Aus den mitgeteilten Versuchen ist jedoch ersichtlich, daß es dem Pilz nur während der Vegetationsruhe gelingt, sich in der gesunden Pflanze auszubreiten. CAYLAY (1923, S. 258) sieht den Winter und das frühe Frühjahr als Infektionszeit an. Da ich bisher auch nur an einjährigen und älteren Zweigen, also Zweigen, die mindestens einmal überwintert haben, Rindennekrosen beobachten konnte, erscheinen mir die Herbstinfektionen für das Auslösen der Erkrankung besonders wichtig.

In Übereinstimmung mit CAYLAY (1923) wurde der Pilz als Wundparasit bezeichnet. Damit erhebt sich die Frage, an welchen Stellen er in die Rinde eindringt. Rindenrisse, Schnittstellen und dergleichen, auf die zumeist verwiesen wird, scheinen nicht allein maßgeblich zu sein. Betrachtet man die Abbildungen 1, 2 und 4b, so fällt auf, daß die Rindennekrosen sich um Blattnarben und Knospen bilden und an der Basis von Kurztrieben liegen. MARSH und NATRASS (1928) und ROBERTS (1940) weisen bereits darauf hin, daß im Zentrum der „canker" tote Knospen liegen. Sie glauben, daß der Pilz durch diese Knospen oder durch totes Gewebe in ihrer Nähe eingedrungen ist. Als Eintrittsstellen für Krankheitserreger finden neuerdings die Blattnarben erhöhte Beachtung. So konnte CROSSE (1951, 1955, 1956) nachweisen, daß *Pseudomonas mors-prunorum* WORMALD im Herbst seinen Weg in die Rinde durch die Blattnarben findet (vgl. hierzu auch CROWDY, 1952). Der Verdacht, daß diese Narben zumindest in vielen Fällen auch die Angriffsstellen für *Phomopsis mali* sind, liegt nahe.

H. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Das Krankheitsbild eines durch *Phomopsis mali* ROBERTS verursachten Rindenbrandes an Zweigen einer etwa 15jährigen Pflaumen-Hochstamm-Anlage wird beschrieben. Stark befallen waren die Sorten Ontario, Gerstetter, Kirkes Pflaume, Gute von Bry und Wangenheims; Zimmers

Frühzwetsche und Nancy Mirabelle wiesen schwächere Schäden auf, die Bühler Frühzwetsche war kaum angegriffen.

2. Die wichtigsten Merkmale des Pilzes werden beschrieben, und ein Überblick über seine Taxonomie wird gegeben.
3. An Zweigen 14jähriger Pflaumenbäume der Sorte Ontario wurden mit Sporen und Myzel von vier Stämmen des Pilzes Infektionsversuche durchgeführt. Die Impfungen erfolgten im August und Oktober 1955 und im April 1956. Die Impfungen im August 1955 und April 1956 verliefen negativ. Die im Oktober 1955 zur Zeit des Blattfalls durchgeführten Impfungen waren dagegen zu 100 % erfolgreich. Die durch den Pilz verursachten Rindennekrosen blieben jedoch örtlich begrenzt und umfaßten den Zweig nur in wenigen Fällen. Unter den angegebenen Bedingungen konnte der Pilz nur während der Vegetationsruhe der Bäume die Rinde zerstören. Der Pilz ist als Wundparasit zu betrachten.
4. Über die Ergebnisse der Infektionsversuche, die mögliche Infektionszeit und die Infektionswege des Pilzes wird diskutiert.

Literaturverzeichnis

Allescher, A., 1901: *Sphaeropsideae* in Rabenhorsts Kryptogamen-Flora, 1. Band, VI. Abt.: Fungi imperfecti. Kummer, Leipzig, S. 231.

Appel, O., und J. Westerdijk, 1919: Die Gruppierung der durch Pilze hervorgerufenen Pflanzenkrankheiten. Z. Pflanzenkrankh. **29**, 176—186.

Barthelet, J., 1943: Recherches sur quelques parasites des arbres fruitiers. Ann. Epiphyt. **9**, 27—45.

Baumeister, G., 1956: Krebsschäden in Junganlagen. Mitt. Obstbauversuchsring Alt. Land **11**, 130—131.

Bedwell, J. L., 1937: Twig blight of asiatic Chestnuts, especially that caused by *Phomopsis*. Phytopathology **27**, 1143—1151.

Briton-Jones, H. R., 1925: On the diseases known as „Bark canker" and „Die-back" in Fruit trees. J. Pomol. **4**, 162—183.

Caylay, D. M., 1923: Fungi associated with „Die-back" in the stone fruit trees. Ann. appl. Biol. **10**, 253—275.

Chupp, C., and G. L. Clapp, 1923: *Fusicoccum* canker on apples. Phytopathology **5**, 225—229.

Crosse, J. E., 1951: The leaf scar as an avenue of infection for the cherry bacterial canker organism, *Pseudomonas mors-prunorum* Wormald. Nature **168**, 560.

— —, 1955: Bacterial canker of stone fruits. I. Field observations on the avenues of autumnal infection of cherry. J. hort. Sci. **30**, 131—142.

— —, 1956: Bacterial canker of stone-fruits. II. Leaf scar infection of cherry. J. hort. Sci. **31**, 212—224.

Crowdy, S. H., 1952: Observations on apple canker. IV. The infection of leaf scars. Ann. appl. Biol. **39**, 569—580.

Das Gupta, S. N., 1933: Studies in the genera *Cytosporina, Phomopsis* and *Diaporthe*. IV. On the pathogenicity of certain strains of *Phomopsis* and *Diaporthe*. Ann. Bot. **47**, 385—400.

Gäumann, E., 1946: Pflanzliche Infektionslehre. Birkhäuser, Basel.

Govi, G., 1951: Un cancro rugoso de pero causato da *Phomopsis mali* Rob. Ann. Speriment. Agr. N. S. **5**, 791—803.

Horne, A. S., and S. N. Das Gupta, 1930: Relative power of attacking of *Diaporthe*, *Cytosporina* and *Phomopsis*. Dept. Sci. and Indus. Res. Rept. Food. Invest. Board for the year 1929, 140—144.

Kidd, M. N., and B. A. Beaumont, 1924: Apple rot fungi in storage. Trans. Brit. Myc. Soc. **10**, 98—118.

Kröber, H., 1956: Rinden- und Fruchtfäule an Kern-, Stein- und Beerenobst durch *Phomopsis*-Arten. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **8**, 161 bis 164.

Laubert, R., und H. Richter, 1932: *Sphaeropsidales* in Sorauers Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Bd. III, 5. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin, S. 444.

Lindau, G., 1922: Die mikroskopischen Pilze. II. Aufl., Springer, Berlin, S. 77.

Marchal, Él. et Êm., 1921: Contribution à l'étude des champignons fructicoles de Belgiques. Bulletin Soc. Bot. Belgique **54**, 109—137.

Marchal, É., 1933: Observations et recherches effectuées à la Station de Phytopathologie de l'État pendant l'année 1932. Bull. Inst. Agron. et Stat. Rech. Gembloux **2**, 147—159.

Marsh, R. W., and R. M. Natrass, 1928: Investigations on Die-back of fruit trees. I. A preliminary experiment and some field observations on *Diaporthe perniciosa* as a cause of „Die-back" of plum trees. Ann. Rpt. Agrig. & Hort. Res. Sta. Long Ashton 1927, 93—98.

Olgivie, L., 1935: The fungus flora of apple twigs and branches and its relation to apple fruit spots. I. Review of literature and preliminary experiments. J. Pom. & Hort. Sci., 140—148.

Roberts, J. W., 1912: A new fungus on the apple. Phytopathology **2**, 263—264.

— —, 1934: Apple target canker, Measles and rough bark. Phytopathology **24**, 16.

— —, 1940: The constriction disease of peach. Phytopathology **30**, 963—968.

— —, 1942: The ascogenous stage of the peach constriction — disease pathogen. Phytopathology **32**, 335—336.

Schmidle, A., 1953: Zur Kenntnis der Biologie und der Pathogenität von *Dothichiza populea* Sacc. et Briard, dem Erreger eines Rindenbrandes der Pappel. Phytopath. Z. **21**, 189—209.

— —, 1957: Über Infektionsversuche an Apfelbäumen mit *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroet., dem Erreger der Kragenfäule. Phytopath. Z. **28**, 329—342.

Smith, E. H., 1916: *Phomopsis mali* on young apple and pear trees in California. Phytopathology **6**, 309.

Weaver, L. O., 1951: The construction disease of peach in Maryland. Plant Dis. Rptr. **35**, 144. Ref.: Rev. appl. Myc. **30**, 522, 1951.

Wehmeyer, L. E., 1933: The genus *Diaporthe* Nitschke and its segregates. Univ. Mich. Press., 349 S.

Zycha, H., 1952: Die *Phomopsis*-Krankheit von Douglasie und Japanlärche. Forstw. Cbl. **71**, 65—79.

— —, 1955: Definition von Rindenbrand und Krebs bei Waldbäumen. Med. Landbouwhogeschool opzoekingst. Gent **20**, 411—418.

Kurze Mitteilungen

Aus dem Institut für allgemeine Botanik der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Direktor: Prof. Dr. H. Wartenberg

Beitrag zur Morphologie und Cytologie von *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub.

Von

M. Schmiedeknecht

Mit 4 Abbildungen

Einleitung

Die Melanconiale *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. war als Parasit unserer Kulturkartoffel in den letzten Jahren wiederholt Gegenstand von Untersuchungen und Diskussionen (Schmiedeknecht 1956, dort weitere Literatur). Dieser Pilz ist oft mit anderen ihm mehr oder weniger ähnlichen Organismen vergesellschaftet und kann leicht mit diesen verwechselt werden. Einer solchen Täuschung unterlagen z. B. Appel und Laubert (1905, 1907), als sie den von Frank (1897, 1898) als *Phellomyces sclerotiophorus* Frank benannten Pilz mit *Spondylocladium atrovirens* Harz identifizierten. 1934 klärte Husz den Irrtum auf, indem er feststellte, daß *Phellomyces sclerotiophorus* mit *Colletotrichum atramentarium* identisch ist und daß Appel und Laubert 1903 ihre Untersuchungen mit diesem Pilz begonnen, aber 1904 und 1905 mit *Spondylocladium* fortgesetzt haben. Auch Crepin (1923), Défago und Gasser (1943), Husz (1953) und Wöstmann (1955) weisen auf die geringen Unterschiede im Erscheinungsbild beider Pilze hin. Neuerdings hat Amann (1956) einen weiteren Sklerotienpilz, *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby, in Gesellschaft mit *Colletotrichum atramentarium* gefunden. Vorliegende Arbeit hat deshalb zum Ziel, die Kenntnisse der Morphologie von *Colletotrichum atramentarium* zu vertiefen, um Verwechslungen mit anderen Pilzen zu vermeiden.

Konidien

Die Konidien von *Colletotrichum atramentarium* sind zylindrisch und an den Enden kegelstumpfartig abgerundet. Ihr basales Ende ist manchmal etwas schmaler als das apikale, und meist sind sie gerade, seltener etwas gekrümmt. Einzeln erscheinen die Konidien farblos hyalin, in Massen rötlich bis gelblich. In einer früheren Arbeit (SCHMIEDEKNECHT 1956) wurde bereits darauf hingewiesen, daß sich in der Mitte der Konidie eine Zone befindet, die sich mit Anilinblau stärker anfärbt. Zytologische Untersuchungen an Konidien nach HEIDENHAIN-Färbung sowie mit der FEULGEN-Reaktion konnten zeigen, daß sich an dieser Stelle, im Plasma eingebettet, der Kern befindet. Die Konidien von *Colletotrichum atramentarium* sind demnach einkernig. Der Kern ist durchschnittlich 1,5 bis 1,7 μ groß. Überreife Konidien bilden oft, bevor sie auskeimen, eine Querwand aus. Die hierfür notwendige Kernteilung konnte jedoch nicht beobachtet werden. Bei solchen Sporen bleiben die Tochterkerne zunächst in der Nähe der Trennwand liegen.

Links und rechts an den Kern schließt sich bei älteren, einzelligen Konidien je eine mehr oder weniger große Vakuole an. Das Plasma befindet sich in größerer Menge nur um den Kern herum und an den beiden Enden der Konidie. Es ist granuliert, und besonders an den Polen befindet sich oft je ein etwas stärker lichtbrechendes Tröpfchen; doch dürfen diese Tröpfchen nicht als charakteristisch angesehen werden, da sie auch in der Mitte der Spore unweit des Kernes beobachtet werden. Mit Sudan III färbt sich das granulierte Plasma intensiv gelbrot, während die Vakuolen ungefärbt bleiben. Oft fällt auch die Stelle im zentralen Plasma, an der sich der Kern befindet, durch Ausbleiben der Sudanfärbung auf. Glykogen- und Volutinnachweise verliefen negativ.

Tabelle 1

Zusammenstellung der Konidiengrößen aus der Literatur

Autor	Jahr	Größe	Substrat
AVERNÁ-SACCÁ	1923	12 – 24,3 × 4 – 6 μ	Wirt
BÖNING	1929	15 – 22 × 4 – 5 μ	Wirt
CHAUDHURI	1924	14 × 5 μ 22 × 3,5 μ	Kart. extr.-Agar Hafermehl-Agar
DÉFAGO u. GASSER	1943	15,1 – 22,3 × 3,9 – 4,47 μ 20,2 – 23,4 × 4,25 – 4,46 μ	Kartoffelagar Kartoffelagar
DICKSON	1926	17,5 – 22 × 3 – 7,5 μ	Wirt
HUSZ	1934	12 – 23,5 × 3 – 5 μ	Pflaumensaft-Agar
WOLLENWEBER u. HOCHAPFEL	1949	26 × 3,9 μ meist 16 – 24 × 3 – 4,9 μ	Wirt

Der Keimschlauch bildet sich an einer Ecke der Konidie (Abb. 1). Mitunter keimen diese auch an beiden Enden mit je einem Keimschlauch aus.

In künstlicher Kultur werden die Sporen in sogenannter freier Konidienbildung direkt am Myzel abgeschnürt, während sie unter natürlichen Bedingungen in Acervuli gebildet werden (siehe SCHMIEDEKNECHT 1956, Abb. 2 u. 3). Die Größe der Konidien schwankt sehr, in der Tabelle 1 sind einige Messungen verschiedener Autoren zusammengestellt.

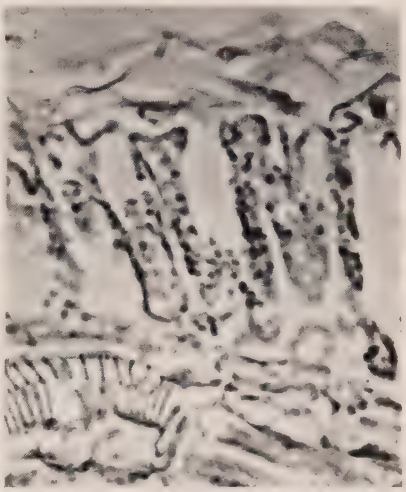


Abb. 1. Keimende Konidie von *Colletotrichum atramentarium* (rechts oben) auf einem Kartoffelblatt (Vergr. 500 ×, Querschnitt)

Acervuli

Die Acervuli von *Colletotrichum atramentarium* sind schwarzgefärbte sklerotiale Gebilde, die in Massen an abgestorbenem Kartoffelkraut gefunden werden. Sie entstehen durch Zusammenballungen von sich verdickenden und anastomosierenden Hyphen. Die äußeren Hyphen verschmelzen zu einer paraplectenchymatischen Peridie, während das Innere dieses sklerotialen

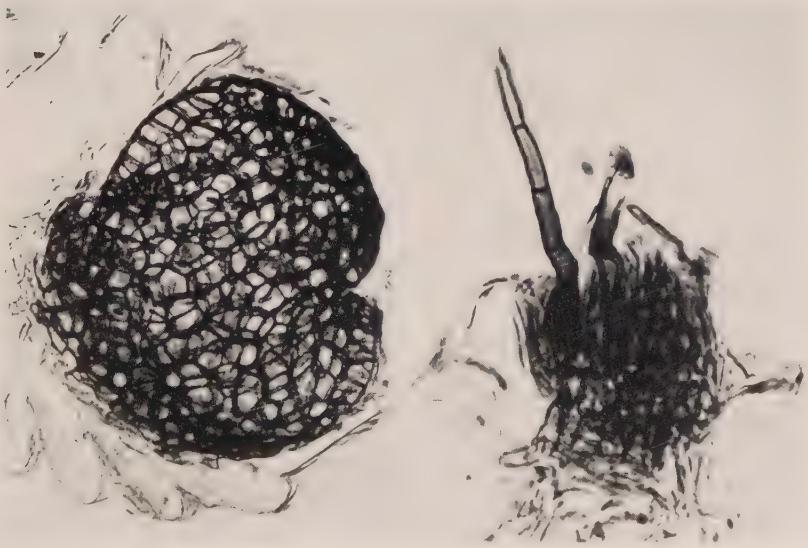


Abb. 2. Links: Peripherer Schnitt durch einen Acervulus, die paraplektenchymatische Peridie zeigend (Vergr. 1000×).
Rechts: Medianer Schnitt durch einen Acervulus, das Prosoplektenchym im Innern zeigend (Vergr. etwa 660×)

Stromas aus einem Prosoplektenchym besteht (Abb. 2). Zunächst sind die Hyphen farblos und reichlich mit Öltröpfchen angefüllt. Später verfärben sich die Membranen dunkler und werden schließlich schwarz. Dieser Vorgang beginnt bei der Peridie und schreitet nach innen weiter fort.

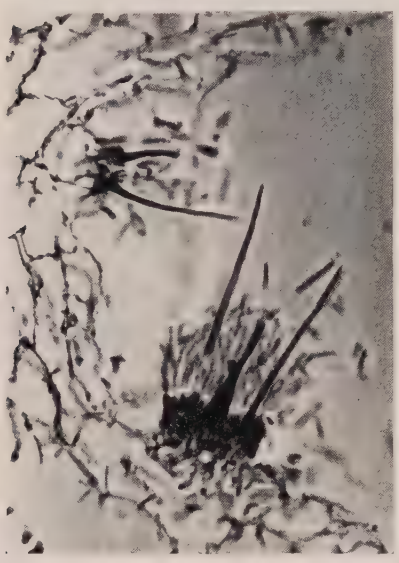


Abb. 3. Acervulus mit geringer Stromaentwicklung (Vergr. etwa 230×)

Das Stroma ist mit Ausnahme der Seite, mit der es dem Substrat aufsitzt, mit hyalinen Konidiophoren besetzt, die sich palisadenartig aneinanderreihen. Sie sind einfach oder verzweigt, zylindrisch mit zahnförmiger oder gerundeter Spitze und können 0 bis 3 Septen besitzen. Auch ihre Größe schwankt sehr; DÉFAGO und GASSER geben 16 bis 60 × 2 bis 5 μ an, während DICKSON nur 10 bis 30 μ gemessen hat. Diese Konidiophoren schnüren an der Spitze nacheinander, aber nicht in Ketten, die Konidien ab (siehe SCHMIEDEKNECHT 1956, Abb. 3). Zwischen den Konidienträgern brechen schwarze Setae hervor. Diese sind mehrzellig und nehmen ihren Ursprung mit einer geschwollenen Basalzelle in dem Prosoplektenchym des Acervulusstromas. Auch die Setae sind zunächst durchsichtig, werden aber viel schneller schwarz als das übrige Stroma. Sie sind gerade oder gekrümmt, zugespitzt und an den Septen etwas eingeschnürt. In Tabelle 2 sind die Größenmessungen verschiedener Autoren zusammengestellt.

Tabelle 2

Zusammenstellung der Borstengrößen aus der Literatur

Autor	Jahr	Größe	Septen
AVERNÁ-SACCÁ	1923	54 – 113,4 × 2,7 – 5,4 μ	
BÖNING	1929	60 – 90 μ	
CHAUDHURI	1924	130 μ	
DÉFAGO u. GASSER	1943	40 – 250 μ meist 130 – 160 μ	
DICKSON	1926	100 – 500 × 5 – 7 μ	2 – 4
DUCOMET	1908	100 – 130 μ	
HUSZ	1953	200 × 4 – 5 μ	
WOLLENWEBER u. HOCHAPFEL	1949	300 × 3 – 7 μ	1 – 4

Die Acervuli werden meist im Substrat eingesenkt, d. h. in den Epidermiszellen gebildet, und brechen bei der Reife hervor, indem sie die obere Epidermiswand mit Kutikula beiseite schieben. Bei einem schnellen Absterben des Wirtes und der damit verbundenen raschen Entwicklung des Parasiten bleibt das Stroma klein und die Hauptmasse des Acervulus wird von den Sterigmen und Borsten gestellt (Abb. 3). Bei langsamer Entwicklung überwiegt das sklerotiale Stroma der Acervuli, das beachtliche Größen erreichen kann, wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist.

Tabelle 3

Zusammenstellung der Acervuligrößen aus der Literatur

Autor	Jahr	Größe	Substrat
Amann	1956	200 – 500 μ	
Bewley u. Shearn	1924	520 – 570 μ	Dox-Agar
Chaudhuri	1924	400 – 500 × 300 – 360 μ 200 – 300 × 150 μ	Hafermehlagar
Défago u. Gasser	1943	70 – 400 γ 2000 – 3000 μ, aber auch nur 60 μ	künstl. Kult
Dickson	1926	100 – 500 μ	
Husz	1953	200 – 500 μ	
Pape	1932	bis 500 μ	
Voss	1955	200 – 500 μ	
Wenzl	1950	200 – 500 μ	
Wollenweber u. Hochapfel	1949	bis 250 oder 500 μ	
Wöstmann	1956	52,5 – 87,5 × 66,5 – 210 μ 70 – 199,5 × 105 – 224 μ	Knolle Knolle

In künstlicher Kultur ist meist die Entwicklung der Acervuli gehemmt. Es entstehen nur Sklerotien ohne Borsten und Konidienträger. Die Entwicklung zu sporulierenden Acervuli kann aber nach Übertragung der Sklerotien auf den Wirt beendet werden.

Myzel

Das Myzel von *Colletotrichum atramentarium* ist wie das der meisten Pilze wenig charakteristisch. Im Wirt sind die Hyphen oft sehr stark septiert und an den Septen etwas eingeschnürt, so daß sie bisweilen nahezu höckrig erscheinen. In den äußeren Geweben des Wirtes wachsen sie in zahlreichen Windungen innerhalb der Zellen, bis diese völlig ausgefüllt sind, während sie in tieferliegenden Geweben mehr geradlinig vordringen. Die Wirtszellen reagieren auf das Eindringen der Hyphen mit Lignituberbildung (Abb. 4).

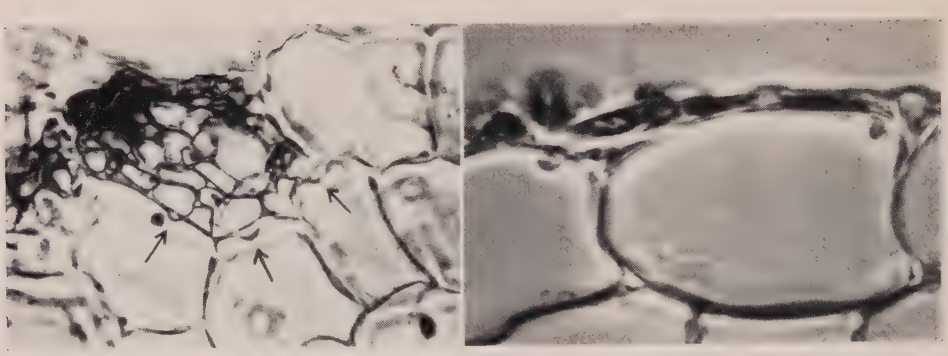


Abb. 4. Links: *Colletotrichum*-Myzel in den Zellen der Kartoffelwurzel. Bei → Übertritt in die Nachbarzellen mit Lignituberbildung (Vergr. 500×).
Rechts: In die Wurzelepidermis eindringende Hyphe. Die Wirtszelle reagiert mit Lignituberbildung (Vergr. etwa 1400×)

Der Zellinhalt ist, in lebendem Zustand beobachtet, hyalin, an den Hyphenenden granuliert, mit Öltröpfchen und kleinen Vakuolen versehen, während er in den älteren Teilen oft optisch leer erscheint. Die zytologische Untersuchung an fixiertem und gefärbtem Myzel ergab, daß die Hyphenenden sehr plasmareich sind, fast keine Vakuolen aber mehrere Kerne enthalten. Die Anzahl der Kerne in diesem Bereich schwankt um drei, es wurden bis zu sechs Kerne in einer Zelle gezählt. Durch wiederholtes Einziehen von Querwänden in älteren Zellen werden die Kerne so verteilt, daß die alten Zellen fast durchweg nur noch einen Kern, höchstens zwei Kerne enthalten. Der einzelne Kern liegt meist in der Mitte der Zelle, das Plasma befindet sich als dünner Schlauch entlang der Membran und ist nur etwas mehr um den Kern und an den Trennwänden angehäuft. Der übrige Zellraum wird durch Vakuolen erfüllt. Auch in den Hyphenzellen konnten keine Kernteilungen beobachtet werden. Die Größe der Kerne in den Hyphen beträgt 0,8 bis 1,2 μ.

Apressorien

Im hängenden Tropfen, aber auch auf der Wirtspflanze, kann man Appressorien beobachten. Ihre Bildung wird eingeleitet, indem die Hyphenenden keulig anschwellen und sich durch eine Septe von dem übrigen Myzel abgrenzen. Während das Anschwellen noch eine Zeitlang weitergeht, färben sich gleichzeitig sowohl Zellinhalt als auch Membran dunkler. In der Mitte dieser Haftorgane kann man sehr oft ein oder mehrere stark lichtbrechende Tröpfchen beobachten. Die Gestalt der Appressorien ist wie ihre Größe sehr unregelmäßig und oft herzförmig. Auch kann man im Hängetropfen nicht selten eine Aneinanderreihung von zahlreichen Appressorien an einer Hyphe beobachten. Die Größe der Appressorien schwankt zwischen 12 und 14 μ (siehe SCHMIEDEKNECHT 1956, Abb. 1).

Literaturverzeichnis

Amann, M., 1956: Ist neben *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. auch *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby am Zustandekommen der „Gummiknollenwelke" der Kartoffel beteiligt? Nachrbl. dtsch. Pflzschutzd. (Braunschw.) **8**, 25—27.

Appel, O., und R. Laubert, 1905: Die Konidienform des Kartoffelpilzes *Phellomyces sclerotiophorus* Frank. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **23**, 218—220.

— —, und — —, 1907: Die Konidienform und die pathologische Bedeutung des Kartoffelpilzes *Phellomyces sclerotiophorus* Frank. Arb. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtsch. **5**, 435—441.

Averna-Saccá, R., 1923: Contribuição para o estudo da biologia da anthracnose da batatinha e principalmente de sua forma ascophora. Bol. agric. Sao-Paulo, ser. 24, **78**, 272—282.

Bewley, F. W., and J. Shearn, 1924: A root disease of tomato caused by *Colletotrichum tabaficum* (Hallier pro parte) Pethybr. Ann. appl. biol. **9**, 244—251.

Böning, K., 1929: Die Brennfleckenkrankheit des Tabaks. Prakt. Blätter Pflz.bau Pflz.schutz **7**, 36—40.

Chaudhuri, H., 1924: A description of *Colletotrichum biologicum*, nov. spec., and observations on the occurrence of a saltation in the species. Ann. bot. **38**, 152 u. 735—744.

Crépin, C., 1923: Dartrose (*Vermicularia varians* Ducomet) et gale argentée (*Spondylocladium atrovirens* Harz) du tubercule de pomme de terre. Rev. path. végét. entom. agric. **10**, 1—6.

Défago, G., et R. Gasser, 1943: La dartrose de la pomme de terre. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **53** A, 480—499.

Dikson, B. T., 1926: The „black dot" disease of potato. Phytopathology **16**, 23—40.

Ducomet, V., 1908: Une nouvelle maladie de la pomme de terre. Ann. écol. nat. agric. Rennes **2**, 24—47.

Frank, A. B., 1897: Kampfbuch gegen die Schädlinge unserer Feldfrüchte. Paul Parey, Berlin.

— —, 1898: Untersuchungen über die verschiedenen Erreger der Kartoffelfäule. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **16**, 273—289.

Husz, B., 1934: Über die Zugehörigkeit von *Phellomyces sclerotiophorus* Frank und dessen Unterscheidung von *Spondylocladium atrovirens* Harz. Z. Pflzkrkh. **44**, 186—191.

— —, 1953: Über die *Colletotrichum*-Welkekrankheit der Kartoffel in Ungarn. Acta agronomica **3**, 57—70.

Pape, H., 1932: *Melanconiales*. In Sorauer, Hdb. Pflanzenkrankh. Bd. III, 543—545.

Schmiedeknecht, M., 1956: Untersuchung des Parasitismus von *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. an Kartoffelstauden (*Solanum tuberosum*). Phytopath. Z. **26**, 1—30.

Voss, T., 1955: Die „*Colletotrichum*-Welkekrankheit" der Kartoffel. Kartoffelbau **5**, 72—74.

Wenzl, H., 1950: Untersuchungen über die *Colletotrichum*-Welkekrankheit der Kartoffel. I. Schadensbedeutung, Symptome und Krankheitsablauf. Pflzschutzber. **5**, 305—344.

Wöstmann, E., 1955: Beobachtungen über Pflanzkartoffelschädigungen 1954/1955. Gesunde Pflanzen **7**, 157—160.

Wollenweber, H. W., und H. Hochapfel, 1949: Beiträge zur Kenntnis parasitärer und saprophytischer Pilze. Z. Parasitenkde. **14**, 216—255.

Besprechungen

Horsfall, J. G., Principles of Fungicidal Action. A New Series of Plant Science Books, Volume 30, Waltham, Mass., USA: The Chronica Botanica Co.; Berlin-Charlottenburg 2: R. Friedländer & Sohn, 1956, 280 S., 16 Abb., 11 Tab., $ 6.50.

Der Verfasser, der schon durch sein 1945 erschienenes Kompendium „Fungicides and their Action" bekanntgeworden ist, hat die gegenwärtigen Kenntnisse über die Wirkungsweise der Fungizide aus nahezu 700 Veröffentlichungen zusammengefaßt. Die praktischen Anwendungsmöglichkeiten von Fungiziden sind dabei bewußt unberücksichtigt geblieben. Während in seinem ersten Kompendium der Erklärung der Wirkungskurven (log-probit dosage-response curve DR, LD) als Hilfsmittel zur Bewertung von Fungiziden eine wesentliche Bedeutung zukam, liegt der Schwerpunkt dieses Werkes in der Erläuterung des Wirkungsmechanismus.

Zunächst werden die biologischen Meßverfahren zur Feststellung der fungiziden Wirkung eines Stoffes und zum Verständnis der Wirkungsweise der Fungizide kritisch dargestellt. Ohne die Bedeutung des Freilandversuches verkennen zu wollen, wird auf die Prüfungsmöglichkeiten im Laboratorium hingewiesen, mit denen sich viele Eigenschaften, wie Hydrolyse, Lichtbeständigkeit, Flüchtigkeit, Netzfähigkeit, Adsorption und Regenbeständigkeit feststellen lassen. Zum Beispiel beruht die ausgezeichnete Regenbeständigkeit der Bordeaux-Brühe nicht nur auf der Bildung von schwer löslichen Kupfersalzen, sondern auch auf der hohen Adsorption an der Blattoberfläche. Letzteres erklärt sich aus der Tatsache, daß die Moleküle der Bordeaux-Brühe elektrisch positiv geladen sind, während die Blattoberfläche negativ geladen ist. Der Wirkstoff haftet so an der Blattfläche, aber das Wasser tropft ab, weshalb auch der Rückstand des Fungizides auf den Blättern dem Logarithmus der Spritzmittel-Konzentration entspricht. Anders verhält sich Zineb, dessen Moleküle eine negative elektrische Ladung tragen.

Anschließend werden die Möglichkeiten aufgezeigt, nach denen der meist wasserunlösliche fungizide Schutzbelag, dessen einzelne Partikel getrennt von den Sporen liegen, wirksam werden kann.

Das Eindringen des Wirkstoffes in die Zellen des Pilzes wird unter mehreren Gesichtspunkten betrachtet. Ein direkter Nachweis eines Fungizides in der Zelle ist nur selten möglich. Meist kann das Eindringen nur indirekt gemessen werden: Chemische Veränderungen des Wirkstoffes oder Zusatzstoffe können die Fettlöslichkeit von Fungiziden und damit ihre Eindringungsfähigkeit erhöhen — die Toxizität steigt. Die Dissoziation von Verbindungen vermindert deren Fettlöslichkeit — die Toxizität sinkt. Außerdem ergeben sich aus der Höhe des durch Lösen von der Pflanzenoberfläche gewonnenen Spritzrückstandes Rückschlüsse auf den eingedrungenen Anteil. Unter dem problematischen Begriff „physikalische Toxizität" werden die Einwirkung von Fungiziden auf die Semipermeabilität der Zellmembranen, die Zerstörung der submikroskopischen Proteinstruktur und die spezifische Wirkung von Mitteln auf Mitose, Sporenkeimung und Myzelwachstum besprochen.

In der zweiten Hälfte des Buches sind die chemischen Einwirkungsmöglichkeiten der Fungizide auf den Stoffwechsel der Pilze zusammengefaßt. Die Betrachtung geschieht zunächst allgemein nach den Lebensvorgängen der Pilze, die gestört werden können, wie Vermehrung, Wachstum, Sporenkeimung, Zellteilung und Baustoffsynthese.

Von einer Reihe chemischer Verbindungen ist bekannt geworden, daß sie als Antienzyme bestimmte Stoffwechselvorgänge blockieren oder in die biologische Wirksamkeit

von Redox-Systemen eingreifen. Einige Pilze sind aber auch in der Lage, Fungizide zu entgiften. Umgekehrt scheint z. B. Hydrochinon durch oxydierende Enzyme der Pilze in die stärker toxische Chinonform umgewandelt zu werden.

Der Theorie über die Chelatbildung wird ein besonderer Abschnitt gewidmet. Danach werden lebensnotwendige Metalle durch Fungizide in sehr stabilen Komplexverbindungen festgelegt. Hiermit kann der Wirkungsmechanismus einer Reihe von Verbindungen, darunter 8-Hydrochinolin, Thiocarbamate und Thiurame, erklärt werden. Die Vorgänge werden dargelegt unter den beiden Gesichtspunkten der Festlegung der lebensnotwendigen Metalle außerhalb des Pilzes, so daß eine Versorgung unterbunden wird, und der Metallbindung innerhalb der Zellen, nachdem das Fungizid eingedrungen ist.

In den letzten Kapiteln wird die Wirkungsweise der Fungizide getrennt nach den folgenden Gruppen ausführlich behandelt: Metalle und ihre Verbindungen, Schwefel, organische Schwefelverbindungen (z. B. Dithiocarbamate, Ziram, Zineb), Chinone und andere Ketone und heterocyclische Stickstoff-, Sauerstoff-, Schwefel- und gemischte Verbindungen (z. B. Captan, Actidion, Furan-, Oxazol- und Thiazolderivate). Dabei wird der Versuch gemacht, die Wirksamkeit der Verbindungen teilweise aus ihrer chemischen Struktur abzuleiten, wobei sich der Verfasser nicht auf die Fungizide beschränkt, die eine wirtschaftliche Bedeutung erlangt haben.

Mit einem Ausblick auf die chemotherapeutische Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten, die nach der Auffindung einer Reihe von organischen Fungiziden mit kurativer Wirkung möglich geworden ist, wird das Werk abgeschlossen.

Der Stoff ist in den 15 Kapiteln übersichtlich gegliedert und durch geschichtliche Rückblicke bereichert. Ein Autoren- und Sachverzeichnis erleichtert das Nachschlagen. Der Autor, der als Forscher aus eigener großer Erfahrung schöpfen kann, hat gezeigt, daß in den letzten Jahren ein beachtlicher Schritt zur Aufklärung der Wirkungsweise der Fungizide gemacht werden konnte, und deutet einen Weg an, auf dem das mehr oder weniger ziellose Suchen nach toxischen Verbindungen durch systematische Forschung abgekürzt werden kann.

SCHUHMANN, Berlin-Dahlem

Mallach, N., Viruskrankheiten und virusähnliche Erkrankungen des Kern- und Steinobstes. Obst- und Gartenbauverlag München 1956. 35 Seiten mit 26, davon 11 farbigen Abbildungen. Preis DM 4,80.

Diese für Obstbaupraxis und Pflanzenschutzdienst gedachte, mit ausgezeichneten, zum Teil farbigen Abbildungen versehene Broschüre behandelt nach einem einleitenden allgemeinen Kapitel die für Europa wichtigsten oder bereits in Deutschland gefundenen Virosen an Kern- und Steinobst und einige virusähnliche Erscheinungen an Obstbäumen. Im einzelnen werden folgende Virosen dargestellt — beim Apfel: 1. Mosaik, 2. Rosettenkrankheit, 3. Flachästigkeit, 4. Hexenbesenkrankheit, 5. Rauhschaligkeit (als Viruskrankheit sicher nachgewiesen, VAN KATWIJK 1955, 1956!), 6. Gummiholzkrankheit und 7. Kleinfrüchtigkeit (= Pendelfruchtkrankheit — Chat fruit, als Virose sicher nachgewiesen, LUCKWIL 1954!), 8. Steinfrüchtigkeit der Birne, 9. Pfeffingerkrankheit der Süßkirsche, 10. Viröse Vergilbung der Sauerkirsche, 11. Ringfleckenkrankheit an Steinobst, 12. Bandchlorose (Bandmosaik) der Pflaume und des Pfirsichs, 13. Sternfleckenkrankheit bei Aprikose, Pfirsich und Zwetsche, 14. Zwergkrankheit der Pflaume und 15. Rosettenkrankheit des Pfirsichs. Für 1, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13 wird das Vorkommen in Bayern angegeben, einige dieser Befunde bedürfen wohl noch der experimentellen Bestätigung. Für jede Virose wird eine ausführliche Beschreibung der Symptome gegeben, die meist durch ein sehr instruktives Schwarz-Weiß- oder Farbfoto ergänzt ist. Es werden weiterhin Sortenanfälligkeit, wirtschaftliche Bedeutung und Verbreitung der Krankheit aufgezeigt. Nach Auffassung der Ref. wäre es zweckmäßiger gewesen, die nichtvirösen oder nur virusverdächtigen Erscheinungen in dieser für die Praxis bestimmten Schrift gesondert an das Ende zu stellen und sie nicht gemeinsam mit den Viruskrankheiten abzuhandeln. Dies würde betreffen: Gelbfleckigkeit der Kirsche (Virusnatur nach BÖMEKE 1954 nicht sicher erwiesen), Verzogenblättrigkeit (Crincle leaf) der Kirsche, Zweigknotigkeit bei „Königin Hortense" (Virusnatur noch nicht nachgewiesen), Weißfleckenkrankheit der Kirsche (Nicht-

übertragbarkeit durch Pfropfung mehrfach nachgewiesen: Chamberlein 1954, Bovey 1954, Blumer 1954/55) sowie die Buntblättrigkeit des Pfirsichs.

Es sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß die Abb. 24 nicht das Symptombild der virösen Sternfleckigkeit wiedergibt, sondern das bereits von Hildebrand 1935 beschriebene und gegen die Virose abgegrenzte nichtpfropfübertragbare Asteroid spot verschiedener Prunusarten. Es geht nach holländischer Auffassung (van Katwijk 1953) auf Bakterienbefall, nach dänischer (Rønde Kristensen 1956) auf Milbenbefall zurück (wahrscheinlich handelt es sich um Eriophiden, Wilson u. Cochran 1952) und ist wohl mit der „Sternfleckenkrankheit der Marille" von Wenzl identisch. Die vom Verf. mitgeteilten Beobachtungen in Baumschulquartieren sprechen gegen die Virushypothese und stützen sie nicht.

Bei dem in mehreren europäischen Ländern Mosaiksymptome an Pfirsich hervorrufenden Virus handelt es sich um eine dem Pflaumenbandmosaik (Bandchlorose, *Marmor lineopictum* Cation) nahestehende Form, die nicht mit dem amerikanischen Pfirsichmosaik identisch ist. Dieses Virus kann auch Bandmosaiksymptome an Aprikose hervorrufen (Chamberlain 1954, unveröffentlichte Versuche der Ref.). Auf dem 3. Symposium für Viruskrankheiten der Obstbäume in Europa 1956 in East Malling wurde daher empfohlen, dieses Virus — um Verwechslungsmöglichkeiten auszuschließen — nur noch als Pfirsichbandmosaik (Peach line pattern) zu bezeichnen. Es müßte also noch experimentell geprüft werden, ob in Bayern tatsächlich das nordamerikanische Pfirsichmosaik vorliegt oder das Bandmosaik. Im letzteren Falle könnte sich die Ref. der Ansicht des Verf. nicht anschließen, mit dem Bandmosaik befallene Ertragsbäume zu entfernen — wenigstens so lange nicht, wie nicht geprüft virusfreies Material aus den Baumschulen zum Nachpflanzen zur Verfügung steht. Solche Bäume sind lediglich von der Reisergewinnung auszuschließen.

Es sei abschließend hervorgehoben, daß diese Schrift auf Grund der guten Abbildungen geeignet ist, den Obstbauer, Baumschuler oder Pflanzenschutztechniker mit den Symptomen der Viruskrankheiten unserer Obstbäume und ähnlichen Erscheinungen vertraut zu machen.

Gisela Baumann, Aschersleben

Soeben erschien:

Bibliographie der Pflanzenschutzliteratur 1946-1947

Herausgegeben von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin-Dahlem

Bearbeitet von

Reg.-Rat Dr. J. BÄRNER

501 Seiten, broschiert DM 44,50

Die „Bibliographie der Pflanzenschutzliteratur" wurde erstmals 1921 herausgegeben und umfaßt in 24 Bänden die Pflanzenschutzliteratur der Jahre 1914—1945 und 1950—1951.

Die soeben erschienene Bibliographie enthält mehr als 13 800 Literaturzitate der Jahre 1946—1947.

Die von Prof. Dr. MORSTATT geschaffene Gruppierung wurde beibehalten. Um jedoch aus dem umfangreichen Material ein schnelles und sicheres Auffinden der gesuchten Literatur zu gewährleisten, wurden die einzelnen Kapitel, ihrem Umfang entsprechend, weiter aufgeteilt.

In Vorbereitung befindet sich: Jahrgang 1948—1949. Erscheint 1957

Die Symptomatologie der Fusarium-Welken der Gurke

(Cucumis sativus L.)

und ihr Verhältnis zu den Welkekrankheiten anderer Pflanzen

Von Dr. W. KOSSWIG

1955. 148 Seiten mit 45 Abbildungen und 8 Tabellen. Kartoniert DM 14,—

Am Beispiel zweier Fusariosen der Gurke (*F. Oxysporum, F. solani*) wird die Bedeutung der Symptomatologie für die Phytomedizin herausgestellt. Dabei werden die Möglichkeiten zur diagnostischen und ätiologischen Auswertung des Krankheistbildes gezeigt und neben den äußeren Krankheitsmerkmalen auch die pathologische Anatomie entsprechend berücksichtigt.

„Es ist das Verdienst des Verfassers, grundsätzliche Fragen der Symptomatologie in größerem Zusammenhang gelöst und in klarer, überzeugender Form dargestellt zu haben."
Berichte über die gesamte Biologie

„Die Arbeit ist mit guten Bildern, insbesondere auch zahlreichen photographischen Wiedergaben mikroskopischer Schnitte durch Leitbündel ausgestattet. Sie gehört in jede phytopathologische Bücherei."
Angewandte Botanik

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Handbuch der Pflanzenkrankheiten

Begründet von

PAUL SORAUER

In sechs einzeln käuflichen Bänden herausgegeben von

Prof. Dr. Dr. h. c. O. APPEL †
Geh. Reg.-Rat, Präsident a. D. der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Prof. Dr. Dr. h. c. H. BLUNCK
ehem. Direktor des Instituts für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn

Prof. Dr. H. RICHTER
Präsident der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

V. Band: Tierische Schädlinge an Nutzpflanzen, 2. Teil

5. Auflage in 5 Lieferungen

Herausgegeben von Prof. Dr. H. BLUNCK

Soeben erschien:

4. Lieferung: **Homoptera II. Teil (*Aphidoidea, Coccoidea*)**

Bearbeitet von Dr. CARL BÖRNER †, Dr. KURT HEINZE, Dr. WERNER KLOFT, Prof. Dr. MANFRED LÜDICKE und Dr. HEINRICH SCHMUTTERER

586 Seiten mit 257 Textabb. Gr. 8°, *Ganzleinen DM 147,—*

Für Bezieher des kompletten Bandes DM 132,30

Es liegen bereits vor:

1. Lieferung: Diptera und Hymenoptera, 1953, 320 Seiten mit 89 Abb. Ganzleinen DM 80,—
2. Lieferung: Coleoptera, 1954, 608 Seiten mit 154 Abb. Ganzleinen DM 144,—
3. Lieferung: Heteroptera, Homoptera I. Teil, 1956, 408 Seiten mit 128 Abb. Ganzleinen DM 94,—

In Vorbereitung befindet sich:

5. Lieferung: Vertebrata. Erscheint Juni 1957.

Besteller, die sich zur Abnahme aller Lieferungen dieses Bandes verpflichten, erhalten auf die angegebenen Preise einen Nachlaß von 10 %.

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Verlag: Paul Parey, (1) Berlin SW 68, Lindenstr. 44-47, Tel. 61 44 68/69. Herausgeber: Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2, Prof. Dr. M. Klinkowski, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. Richter, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Straße 19. Printed in Germany. Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin SO 36.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe vorbehalten.

— Erscheinungsweise: Jährlich etwa 10—12 Hefte (4 Hefte = 1 Band).